ARCHIV
FÜR
MIKROBIOLOGIE

BEGRÜNDET VON

J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

C. B. VAN NIEL
PACIFIC GROVE

R. NILSSON
UPPSALA

E. G. PRINGSHEIM
GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE

W. H. SCHOPFER
BERN

H. TAMIYA
TOKIO

UND DEN SCHRIFTLEITERN

A. RIPPEL-BALDES
GÖTTINGEN

R. HARDER
GÖTTINGEN

20. BAND

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1954

Alle Rechte vorbehalten.
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg.
Printed in Germany.

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH.

64-07696 EW

QR1
A7

Inhaltsverzeichnis.

v.20

Seite

Heft 1

Uebelmesser, E.-R., Über den endonomen Tagesrhythmus der Sporangienträgerbildung von Pilobolus. Mit 18 Textabbildungen 1

Baalsrud, K., and K. S. Baalsrud, Studies on Thiobacillus denitrificans. With 8 figures in the text 34

Schröder, B., Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Neutralsalze auf Wachstum, Zellform und Fadenbildung von Stichococcus bacillaris und einigen anderen Grünalgen. Mit 18 Textabbildungen 63

Rother, W., Einfluß von β-Indolylessigsäure und wasserlöslichen Wirkstoffen des Mais-Scutellums auf Keimung und Wachstum von Phycomyces Blakesleeanus. Mit 7 Textabbildungen 89

Nilsson, G., and P. E. Nilsson, Some Observations on the Use of Cylinders Made from Different Materials in the Cylinder Plate Method. With 1 figure in the text 109

Heft 2

Kox, E., Der durch Pilze und aerobe Bakterien veranlaßte Pectin- und Cellulose-Abbau im Hochmoor unter besonderer Berücksichtigung des Sphagnum-Abbaus. Mit 5 Textabbildungen 111

Martin, H. H., Beitrag zur Kenntnis der Morphologie und Physiologie der Nektarhefe Candida Reukaufii (Grüss) Diddens et Lodder. Mit 12 Textabbildungen 141

Domsch, K. H., Keimungsphysiologische Untersuchungen mit Sporen von Erysiphe graminis. Mit 4 Textabbildungen 163

Bömeke, H., Über das Verhältnis des oxydierten Stickstoffs zum reduzierten Kohlenstoff beim Nitratbildner. Mit 1 Textabbildung 176

Thiagarajan, T. R., and M. K. Subramaniam, Studies on the Cytology of Yeasts. IX. Cytology of Cells from a two-day old Giant Colony. With 4 figures in the text 183

Wikén, T., H. Somm und F. Sulzer, Untersuchungen über den Wuchsstoffbedarf einiger Kulturweinhefen. Mit 1 Textabbildung 201

Carlson, S., Der Einfluß niederer Wechselströme auf die enzymatische Tätigkeit von Sproßpilzen unter aeroben Kulturbedingungen 221

Coleman, R. J. and F. F. Nord, Application of Mixed Substrates to the Study of Pyruvic Acid Formation by Fusarium lini Bolley 230

Heft 3

Starr, T. J., and H. P. Klein, Enzymes involved in the utilization of carbohydrates by two strains of myxobacteria. With 3 figures in the text . . . 235

Floethmann, E., Cytologische Untersuchungen an Azotobacter chroococcum Beij. Mit 7 Textabbildungen 243

Wetter, C., Über die Wirkung von Agar und Polyvinylalkohol auf das Wachstum von Aspergillus niger. Mit 5 Textabbildungen 261

Seite

Tamm, B., Experimentelle Untersuchungen über die Verbreitung des bakteriellen Pflanzenkrebses und das Auftreten von Sekundärtumoren. Mit 1 Textabbildung 273

Schlegel, H.-G., Die Rolle des molekularen Wasserstoffs im Stoffwechsel der Mikroorganismen. Mit 1 Textabbildung 293

Heft 4

Castelli, T., Les Agents de la Fermentation Vinaire. Avec 2 figures dans le texte 323

Harder, R., und W. Koch, Zur Frage nach der Identität von Pedinomonas Korschikov und Chlorochytridion Vischer 343

Baldacci, E., C. Spalla and A. Grein, The Classification of the Actinomyces Species (= Streptomyces) 347

Oppermann, A., und A. Kawe, Untersuchungen über die Beeinflussung des Bakteriengehalts und der Nährstoffe im Boden durch den Riesentrichterling (Clitocybe gigantea Sow). Mit 1 Textabbildung 358

Knösel, D., und W. Schwartz, Untersuchungen zur Erdölbakteriologie. II. Über Vorkommen und Verhalten von Mikroorganismen in Erdöl. Mit 5 Textabbildungen 362

Droop, M. R., Conditions governing Haematochrome Formation and Loss in the Alga Haematococcus pluvialis Flotow. With 2 figures in the text . . . 391

Nilsson, P. E., and C. Rydin, Studies on symbiotic nitrogen fixation by a new strain of tetraploid red clover (UO36). With 3 figures in the text 398

Nilsson, P. E., K. Korsan-Bengtsen and O. Mellander, Amino acid content of leguminous proteins as affected by genetic and nutritional factors. I. . 404

Meffert, M.-E., Ein Beitrag zur Wirkung diskontinuierlicher Belichtung auf die Massen- und Individuenvermehrung von Chlorella vulgaris. Mit 9 Textabbildungen 410

Gaertner, A., Beobachtungen über die Bewegungsweise von Chytridineenzoosporen. Mit 1 Textabbildung 423

Berichtigung zur Arbeit von K. H. Domsch 426

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 1—33 (1954).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen.)

Über den endonomen Tagesrhythmus der Sporangienträgerbildung von Pilobolus*.

Von

ESTHER-RUTH UEBELMESSER.

Mit 18 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Juni 1953.)

In neuerer Zeit sind über die periodische Entwicklung der Sporangienträger von *Pilobolus* 2 Arbeiten, von McVICKAR (1942) und D. KLEIN (1948), erschienen. McVICKAR schließt aus seinen Versuchen mit *Pilobolus microsporus*, daß die Tagesperiodizität der Sporangienbildung nicht autonom, sondern allein durch den täglichen Wechsel von Licht und Dunkelheit bedingt sei; D. KLEIN, die wie McVICKAR als Maß für die Periodizität die Anwesenheit reifer Sporangien am Ende der Dunkelzeit und ihre Abwesenheit am Ende der Lichtzeit benutzte, hat den größten Prozentsatz reifer Sporangien am Ende der Dunkelzeit bei einem Licht-Dunkelwechsel von 16:16** Std gefunden. Sie schließt daraus, daß dieser Beleuchtungswechsel von dem Pilz bevorzugt würde vor den Zyklen 9:15, 12:12 und 15:9. Bei einem Wechsel von Licht und Dunkelheit in den Zyklen 4:4, 8:8, 24:24, 4:20 und 20:4 fand sich keine Periodizität. Sie konnte aus ihren Ergebnissen jedoch keinen Schluß darüber ziehen, ob die Reaktion durch genetische oder durch Umweltsfaktoren bedingt sei.

Die nachstehenden Untersuchungen wurden deshalb mit dem Ziel begonnen, zu untersuchen, ob unter geeigneten Bedingungen die Wirksamkeit endonomer Faktoren bei der Sporangienbildung von *Pilobolus* festgestellt werden kann und wie weit diese etwa durch von Außeneinflüssen gesteuerte Rhythmen überlagert wird. Als die Untersuchungen schon 1 Jahr im Gang waren, erschien eine Arbeit von SCHMIDLE (1951) über die Tagesperiodizität der asexuellen Reproduktion bei *Pilobolus sphaerosporus*. Er fand, daß Kulturen, die 12:12, 15:15, 6:6 und 3:9stündigen Lichtwechseln ausgesetzt waren, ihre Sporangien in der darauffolgenden Dunkelheit in einem angenähert 24stündigen Rhythmus abschossen. Auch nach 1maliger Lichteinwirkung von verschiedener Länge (9 Std bis 3 Tage) trat im anschließenden Dauerdunkel eine etwa 24stündige Rhythmik ein. Periodischer Temperaturwechsel von 20 und 25° C und 1malige Temperaturerhöhung von 20 auf 24° C lösten wie die Beleuchtungszyklen im Dauerdunkel Periodizität aus. SCHMIDLE schließt daraus, daß die rhythmischen Erscheinungen der Sporangien-

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät in Göttingen.

** Die Dunkelstunden sind jeweils unterstrichen.

bildung bei *Pilobolus sphaerosporus* im Zusammenwirken von äußeren und inneren Faktoren entstehen. Seine Arbeit gab mir dann die Anregung unter anderem einige Temperaturversuche auszuführen.

I. Experimenteller Teil.

A. Material und Methode.

1. Pilzmaterial und Kulturmethode.

Die Versuche wurden mit Reinkulturen von *Pilobolus sphaerosporus* (Grove) und *crystallinus* (Klein) gemacht. Auf Agarmedien („Pferdemistagar" nach Bersa, 1929, und „Bovungagar" nach McVickar, 1942) war die tägliche Sporangienträgerbildung schlecht (nur etwa 20% der auf Pferdemist ohne Agar), und das Auswachsen der Wurzelblasen zu Sporangienträgern wurde ungünstig beeinflußt (vgl. McVickar). Das Substrat sollte natürlich bei allen Versuchen dieselbe Zusammensetzung haben, deshalb kam auch reiner Pferdemist nicht in Frage, der immer frisch gesammelt sein mußte, damit sich der Pilz gut entwickelte. Durchsichtigkeit des Nährbodens war dagegen nicht erforderlich, darum wurde derselbe Handelsdünger (Bovung, ein Produkt der Walker-Gordon-Laboratorien in New Jersey, USA), aus dem McVickar und D. Klein Dekokte bereitet hatten, einfach als Breiaufschwemmung benutzt. 100 g Bovung wurden mit 200 cm^3 destilliertem Wasser zu einem Brei angerührt, fraktioniert sterilisiert und steril in Petrischalen von 9 cm ∅ in einer Schichtdicke von ungefähr 1 cm eingefüllt. Nach Glättung der Oberfläche wurde jede Schale mit 4 Sporangien in regelmäßigen Abständen voneinander beimpft und mit einer Scheibe Filterpapier (nach Pringsheim u. Czurda, 1927) bedeckt, die sich sofort vollsaugte und die Farbe des Düngers annahm. Das p_H betrug beim frischen Nährbrei 6,5—6,7, am Ende der Versuche 7,0—7,2. Nach dem Impfen kamen die Kulturen in einen Thermostaten (22 ± 0,2° C) oder in eine große, gut isolierte Kochkiste (20 ± 0,5° C); in beiden herrschte völlige Dunkelheit. 5 Tage nach dem Impfen konnten die Kulturen in den Versuch genommen werden, dabei wurde Belichtung sorgfältig vermieden.

2. Versuchsanordnung.

Als Maß für die Tagesperiodizität kann der periodische Sporangienabschuß benutzt werden, da er die Folge der periodischen Sporangienträgerentwicklung ist. Zum Auffangen der Sporangien dienten folgende Einrichtungen:

In einem Dunkelzimmer waren auf einem Tisch 2 Dunkelzelte (Lattengerüste von 60 × 70 × 120 cm mit Bezug von schwarzem Stoff) aufgebaut, die gegeneinander und gegen die Dunkelkammer lichtdicht abgeschlossen waren. Jedes Dunkelzelt enthielt einen oben offenen Blechkasten, der nach den anderen 5 Seiten mit einer 10—15 cm dicken Isolierschicht aus Sägemehl umgeben war und in einem größeren Pappkasten stand. In den mit schwarzem Papier ausgeschlagenen Blechkästen wurden je 4 Petrischalen nebeneinander gestellt. Die Beleuchtung befand sich in 1 m Abstand darüber und erfolgte je nach der erforderlichen Intensität mit Osram-Glühbirnen verschiedener Wattzahl, die hinter Kühlküvetten mit 10 cm durchfließender Wasserschicht brannten. Die Temperatur an den Kulturen betrug 20° C; sie wurde beim Wechseln der Deckel der Petrischalen (jeweils alle 3 Std) kontrolliert. Die Pilze in den Schalen hatten während dieser Zeit ihre Sporangien gegen den Schalendeckel geschossen, und durch Auszählen konnte nun festgestellt

werden, wie die Verteilung der Abschüsse im Laufe des Tages gewesen war (vgl. SCHMIDLE, 1951).

Für exaktere Werte mußte der Abschuß in kürzeren Intervallen ermittelt werden. Dazu wurde ein Thermostat gebaut mit einer Apparatur, die nach dem Prinzip eines Fließbandes arbeitete und die Abschüsse alle halbe Stunde mechanisch erfaßte; mit ihr wurde die größte Zahl der Versuche ausgeführt. Die Kulturen, die während der ganzen Versuchsdauer unverändert an ihrem Platz blieben, konnten dabei wechselnden Temperatur- oder Lichtzyklen ausgesetzt werden, während alle übrigen Bedingungen konstant blieben (relative Luftfeuchtigkeit 98% ± 0,2%, Temperatur bei den Beleuchtungsversuchen 22° C ± 0,2°).

Der Thermostat (Abb. 1) war ein doppelwandiger, rechteckiger Kasten (80 × 50 × 60 cm) aus Zinkblech mit einem 2 cm dicken Wassermantel (TW),

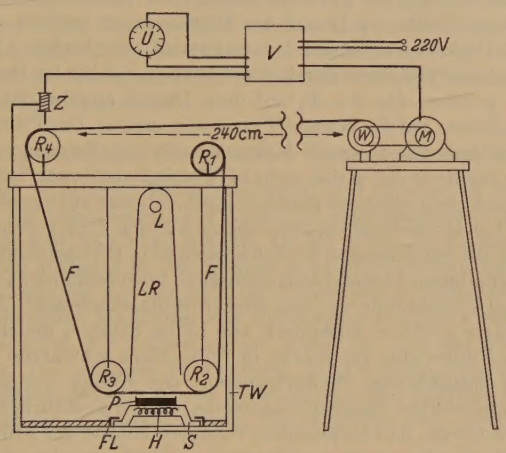


Abb. 1. Thermostat mit Apparatur zum Auffangen der Sporangien. *TW* Thermostat mit Wassermantel, *S* Schieber, *P* *Pilobolus*kultur, *FL* Führungsleiste, *H* Heizung des Schiebers, *F* Filmfolie, R_1 Vorratsrolle, R_{2-4} Umlenkrollen, *L* Lichtquelle, *LR* Lichtreflektor, *Z* Zeittupfer, *W* Walze, *M* Motor, *V* Schaltrelais, *U* Schaltuhr.

der elektrisch beheizt und durch ein Kontaktthermometer auf gleichmäßiger Temperatur gehalten wurde. Oben war er dicht mit einem Holzdeckel verschlossen. Durch eine Tür (14 × 8 cm) an der einen Schmalseite des Kastens wurden die Petrischalen-Kulturen hineingeschoben. Zu jedem Versuch wurden 5 neue Kulturen benutzt. Die offenen Petrischalen (*P*) standen in einer Reihe hintereinander, von schwarzen Blechringen festgehalten, auf einem Zinkblechschieber (*S*), der zwischen 2 Führungsleisten (*FL*) in Längsrichtung in den Thermostaten geschoben wurde. In den doppelten Boden des Schiebers war für kurze Temperaturerhöhungen bei den Temperaturversuchen eine Heizspirale (*H*) eingebaut. Für die Versuche mit Licht war eine Osram-Leuchtstoffröhre, Typ Tageslicht, 40 Watt (*L*) von 72 cm Länge unmittelbar unter den Deckel des Thermostaten montiert. Eine Kühleinrichtung war hierbei überflüssig. Das Licht wurde durch einen Reflektor (*LR*) aus weißem Papier auf die Kulturen konzentriert und gegen den übrigen Raum des Thermostaten abgeschirmt. Die Intensität der Beleuchtung, gemessen mit einem AEG-Luxmeter und einer Selenphotozelle nach LANGE, betrug an den Kulturen etwa 1500 Lux. Für gleichmäßige Luftfeuchtigkeit im Innern war der Boden des Thermostaten mit einer 2 cm hohen Wasserschicht bedeckt und die Wände waren mit nassem Fließpapier bekleidet, das von unten Wasser nachsaugte. Die geringen

Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen (aufgezeichnet durch einen Thermo-Hygrographen) verliefen nicht periodisch, so daß sie keine Rhythmik bei den Versuchsergebnissen vortäuschen konnten. Die Temperatur an den Kulturen wurde mit einem Winkelthermometer gemessen. Sie stimmte mit der durch den Thermo-Hygrographen registrierten Temperatur überein.

Als Fließband (F) wurde ein durchsichtiger Acetatrohfilm (ohne Gelatineschicht) von 60 cm Breite und 48 m Länge benutzt, der in 0,5 cm Abstand über den *Pilobolus*-Kulturen zwischen diesen und der Lichtquelle geführt wurde. Er ist praktisch unzerreißbar und läßt sich leicht reinigen und mit Alkohol sterilisieren, so daß er nacheinander für viele Versuche benutzt werden konnte. Er war in seiner Länge in 20 Bahnen von je 240 cm Länge zerschnitten, die an ihren Schnittseiten perforiert und in der Perforation wieder zusammengenäht waren (siehe unten). Der Film wurde von einer Vorratsrolle (R_1), die auf dem Deckel des Thermostaten montiert war, durch einen schmalen Schlitz ins Innere des Thermostaten geführt, wurde von 2 an der Unterseite des Deckels fest hängend montierten Umlenkrollen (R_2 und R_3) über die Petrischalen geleitet und dann durch einen zweiten Schlitz im Deckel zur dritten Umlenkrolle (R_4) geführt, die wie R_1 auf dem Deckel angebracht war. Von dort lief er weiter in Richtung auf die Walze (W) zu (siehe unten). Der Film wurde in seiner ganzen Breite von dem Pilz in den 5 Kulturschalen mit Sporangien beschleudert. Alle halbe Stunde rückte er um etwas mehr als Petrischalenbreite weiter. Da der Abschuß senkrecht nach oben nicht nur phototropisch, sondern auch geotropisch geregelt ist, wurden auch bei Dunkelheit die Sporangien auf den Film geschossen. Auf diese Weise bildeten sich die beschossenen Stellen kreisrund in Petrischalengröße nebeneinander und, in ½stündigem Abstand aufgenommen, hintereinander auf dem Film ab.

Über der dritten Umlenkrolle war eine Elektrospule angebracht (Z), deren hohler, mit Druckerschwärze gefüllter Eisenkern alle halbe Stunde, gleichzeitig mit dem Weiterrücken des Filmes eine Zeitmarke in Form eines schwarzen Tupfens an der Seite abgab. Der halbstündige Weitertransport des Filmes um genau 10 cm erforderte einen komplizierten Schaltmechanismus, dessen ausführliche Beschreibung hier zu weit führen würde. Aus technischen Gründen konnte der Film nicht in seiner ganzen Länge auf eine Trommel gerollt werden (Größerwerden des Radius hätte gleichmäßiges Fortrücken um 10 cm sehr kompliziert); er wurde daher an einer Leiste befestigt, die sich an einer 240 cm langen Schnur vorwärtsziehen ließ. 10 cm der Schnur wurden alle halbe Stunde auf die durch einen Elektromotor (M) sich drehende Walze mit genauen Arretierungen (W) nebeneinander gewickelt. Der Motor wurde durch eine Uhr (U) geschaltet, deren großer Zeiger bei 6 und 12 des Zifferblattes stets an einer Kupferlamelle Kontakt gab. Die pünktliche Ausschaltung nach Umlauf der Walze um 10 cm erfolgte auf mechanischem Weg durch Hebel mit Isolation unabhängig vom Weiterrücken des Uhrzeigers. Also liefen innerhalb von 12 Std 240 cm Film über die Petrischalen. Der Film konnte an den zusammengenähten Stellen leicht abgetrennt, die Schnur von der Walze abgewickelt und das neue Ende des Filmes wieder an der Walze befestigt werden.

Die ganze Anlage stand im Dunkelzimmer. Sie konnte wochen- und monatelang pausenlos Tag und Nacht arbeiten.

Die festklebenden Sporangien wurden über Millimeterpapier mit einem elektrischen Zählstift ausgezählt, danach wurden die Filmbahnen gereinigt, an den perforierten Stellen wieder zusammengenäht und auf die Vorratsrolle aufgerollt.

3. Lichtquellen.

Als Lichtquellen dienten verschiedene Osram-Glühbirnen und schwache Niederspannungslampen (Akkumulatorenspeisung). Alle Lampen wurden ständig photometrisch kontrolliert. Kurze Lichtblitze wurden mit einer 15 Watt-Birne und dem

Compurverschluß eines Photoapparats (Fa. Goerz) gegeben; der Compurverschluß schaltete bis hinab zu $^1/_{200}$ sec. Verschiedene Intensitäten der Lichtblitze wurden durch Veränderung des Abstands von den Kulturen erreicht.

4. Wärmequellen.

Kurze tägliche Temperaturerhöhungen wurden durch Einschalten der Heizspirale (*H*) im Boden des Schiebers, auf dem die Kulturen standen, erzeugt. Die Temperatur in den Petrischalen stieg dabei je nach der Stromstärke, die mit einem Schiebewiderstand geregelt wurde, im Laufe von 8—10 min bis zu der gewünschten Höhe (um 5 oder 10°) an. Durch Herabsetzen der Stromstärke wurde sie weitere 10 min auf dieser Höhe gehalten. Nach Ausschalten der Heizspirale erfolgte allmähliche Abkühlung (ohne besondere Kühlung), so daß etwa 1 Std nach Beginn des Anheizens in den Kulturen wieder die Ausgangstemperatur herrschte. Die Lufttemperatur im Thermostaten erhöhte sich während der Erwärmung der Kulturen nur um 0,2° C. Bei den einzelnen Versuchen war die Grundtemperatur, die täglich 23 Std einwirkte, entweder 20 oder 25° C. Der Thermostat wurde jeweils auf diese Temperatur eingestellt.

5. Auswertung der gezählten Sporangienabschüsse.

Die Werte der 5 in einer Reihe stehenden und gleichzeitig schießenden Petrischalen wurden für jede Zählung gemittelt. Die abgeschossenen Sporangien wurden alle halbe Stunde bzw. alle 3 Std gezählt. Da bei normalen Kulturen niemals beobachtet wurde, daß vorhandene Sporangien nicht abgeschossen wurden, ist die Zahl der gezählten Abschüsse mit der Zahl der vorhandenen Sporangien identisch. Für das tägliche gemittelte Maximum des Sporangienabschusses wurde die Zeit der 5 Einzelmaximalwerte der 5 Petrischalen gegen die Zeit des mittleren Maximalwertes gesichert. Die zeitliche Abweichung der täglichen einzelnen Maxima vom gemittelten täglichen Maximum war meist gering. Der mittlere Fehler betrug für die meisten Versuche $\pm$ 3 bis $\pm$ 8 min. Wo er größer war, ist er angegeben.

B. Versuchsergebnisse.

1. Vorversuche.

a) Das Verhalten im „natürlichen" Tag und im 12:12-Stundentag.

Unter natürlichen Bedingungen entwickelt *Pilobolus* seine Sporangienträgeranlagen (Wurzelblasen oder Trophocysten) in der Nacht. Die morgens gelbroten Knöllchen wachsen am Nachmittag zu Trägern aus, abends zeigen diese die Anlage der Sporangien als gelbrote Köpfchen. Die Bildung der subsporangialen Blase sowie das Reifen der Sporen erfolgt in der zweiten Nacht. Einige Stunden nach Sonnenaufgang am nächsten Tag beginnt der Sporangienabschuß (Grantz, 1898, Palla, 1900, und Buller, 1934).

Von jeder der beiden *Pilobolus*-Arten waren 7 Stämme vorhanden[1]; die einzelnen Phasen der Entwicklung traten bei den verschiedenen Stämmen jeder Art im natürlichen Langtag (Mai) wie im 12stündigen Tag überwiegend im gleichen Zeitpunkt auf, die Entwicklungsdauer bis zum Sporangienabschuß war bei *Pilobolus sphaerosporus* dagegen etwa

[1] Davon stammten 2 aus dem Zentralbüro für Schimmelkulturen in Baarn, die anderen waren selbst isoliert worden.

4 Std kürzer als bei *crystallinus*: Das Abschleudern der Sporangien begann bei *sphaerosporus* etwa 24 Std nach Lichtbeginn, erreichte 4 Std später sein Maximum und dauerte danach noch 4 Std an; bei *crystallinus* war alles ebenso, alle Punkte lagen aber etwa 4 Std später.

b) Dauerlicht oder Dauerdunkel im Anschluß an den 12:12-Stundentag.

Wurde nach mehrmaligem 12stündigen Wechsel von Licht und Dunkelheit Dauerlicht gegeben, so hörte die periodische Sporangienträgerbildung nach Einsetzen des Dauerlichtes auf, wie auch schon McVickar (1942) und D. Klein (1948) gefunden haben. Es wurden zwar fortlaufend Sporangien gebildet, aber sie wurden auch fortlaufend abgeschossen. Wurde statt Dauerlicht Dauerdunkelheit angeschlossen (Versuche, die von McVickar u. D. Klein nicht angestellt wurden), so wurde die periodische Sporangienbildung und das periodische Abschießen der Sporangien von *Pilobolus sphaerosporus* noch mehrere Male fortgesetzt (Abb. 2); *Pilobolus crystallinus* aber stellte die Sporangienbildung ganz ein. (Nach Palla kann er im Dunkeln gar keine Sporangien bilden.) Schmidles Ergebnisse waren die gleichen wie die eigenen.

c) Dauerlicht und Dauerdunkel ohne vorhergehende rhythmische Beleuchtung.

Nach McVickar werden die Trophocysten im Dauerlicht fortwährend gebildet und auch alle Bildungsstadien von Trophocysten und daraus herauswachsenden Sporangienträgern angetroffen. Dies konnte in eigenen Versuchen mit *Pilobolus*mycel in Bovungagarkulturen wie auf Bovungbreikulturen ebenfalls beobachtet werden; dabei war die Bildung der Sporangienträger auf letzteren viel zahlreicher: Bovungagarkulturen im Dauerlicht täglich rund 200, Bovungbreikulturen 1000 Abschüsse; im Dauerdunkel 500 bzw. 2000 Abschüsse. Dauerlicht wirkte also auf die zahlenmäßige Ausbildung der Sporangienträger stärker hemmend als Dauerdunkel. In beiden Fällen aber wurden mehr Wurzelblasen neu gebildet als nachher zu Sporangien auswuchsen, so daß sowohl im Dauerlicht als auch im Dauerdunkel sich Wurzelblasen ansammelten. Diese wuchsen, wenn nach Dauerdunkel Licht einsetzte, alle *gemeinsam* aus. Dadurch war am Tag nach Lichtbeginn ein hoher Anstieg der Abschußkurve zu verzeichnen (Abb. 3, Kurve II). Wurde dann dauernd weiter beleuchtet, so sank die Zahl der Sporangienabschüsse bald unter die im Dauerdunkel gezählte ab. Im umgekehrten Fall, wenn Dauerlicht vorangegangen war, begann die Zahl der Abschüsse allmählich im Dauerdunkel anzusteigen, bis zu der Höhe, die dann beibehalten wurde (Abb. 3, Kurve I). Hier lag also in keinem Fall rhythmisches Verhalten vor. Die Versuche im Dauerlicht wurden bei 1500 Lux und bei 650 Lux mit den gleichen Ergebnissen ausgeführt.

Schmidle hat bei solchen Versuchen genau das umgekehrte Ergebnis erhalten: Anstieg der Abschüsse im Dauerlicht und Absinken der

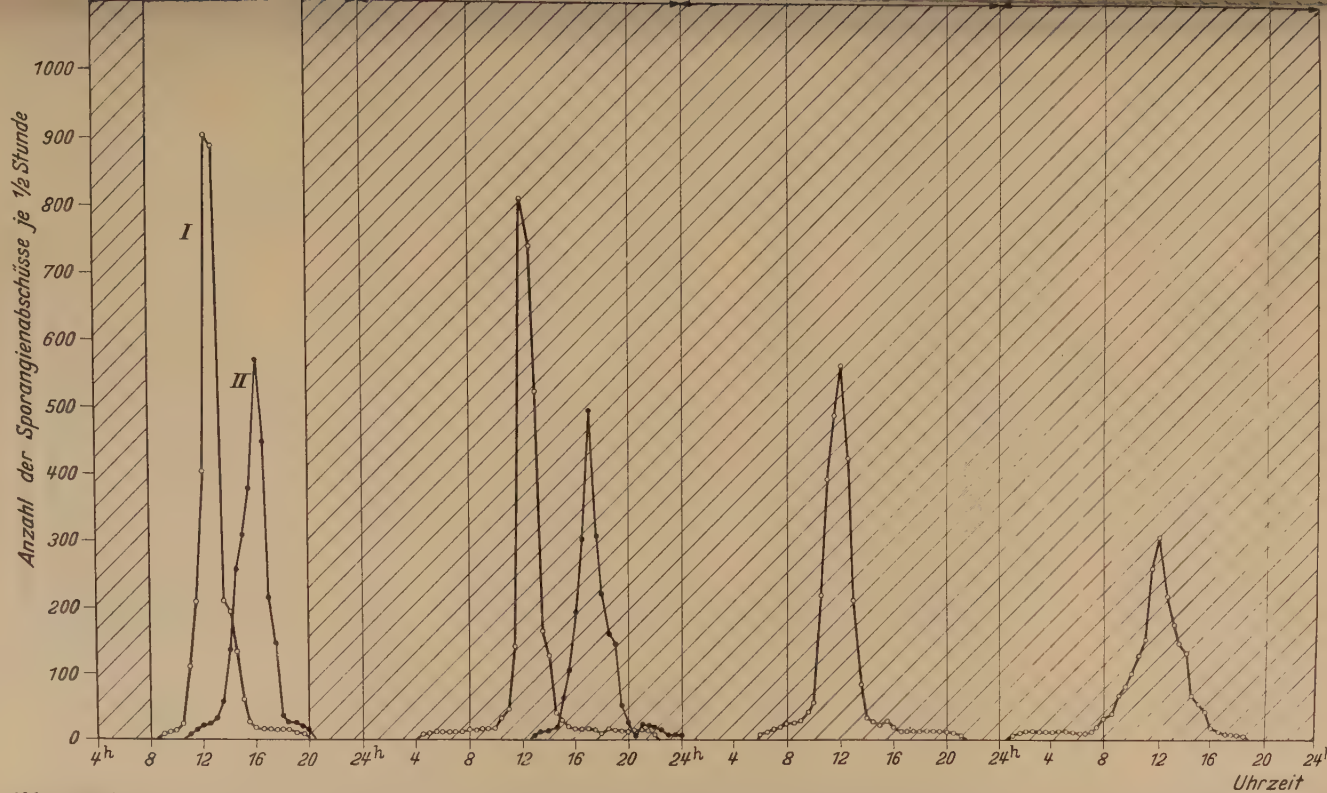


Abb. 2. 12:12stündiger Licht-Dunkelwechsel mit anschließendem Dauerdunkel. Auf der Abszisse ist die Zeit, auf der Ordinate die Anzahl der abgeschleuderten Sporangien abgetragen. Die Dunkelstunden sind schraffiert. Erster Lichtbeginn am 13. 9. um 8 Uhr. Am 14. 9. haben beide Pilze ganz ähnlich geschossen wie am 15. 9. Kurve *I*: *Pilobolus sphaerosporus*; Kurve *II*: *Pilobolus crystallinus*.

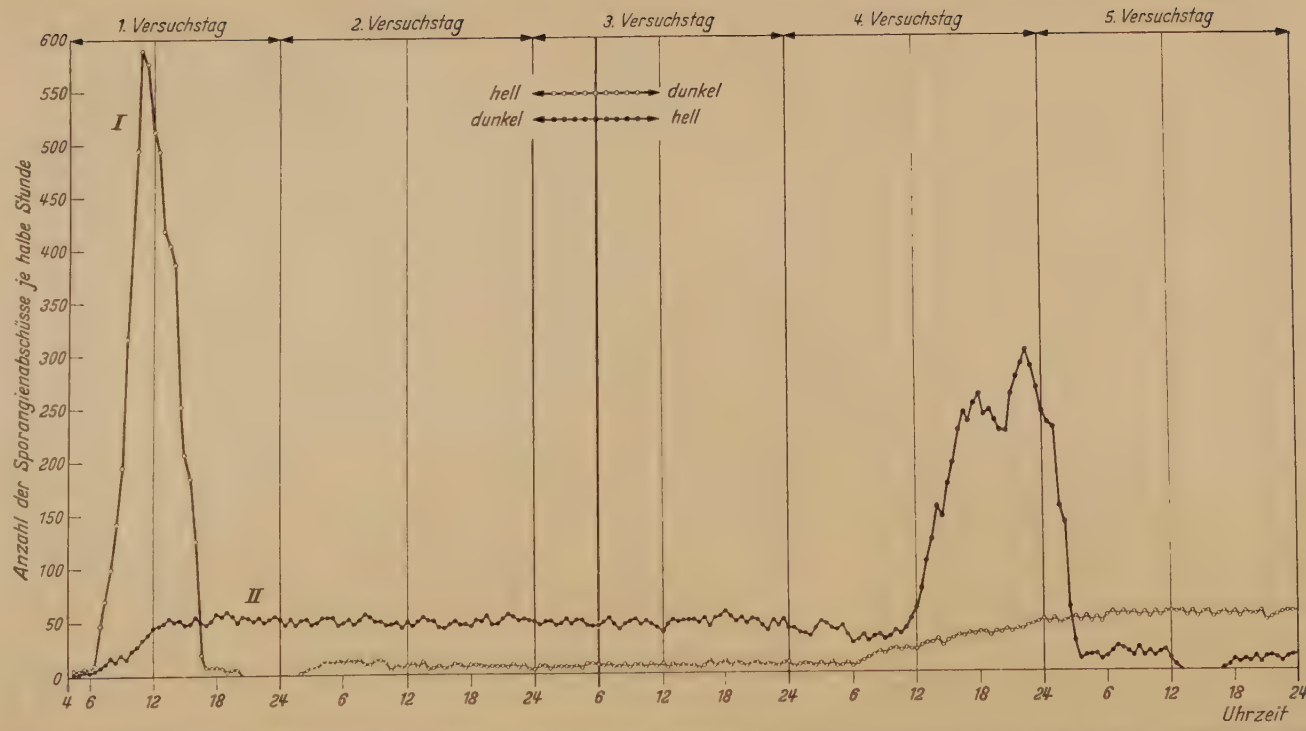


Abb. 3. Sporangienabschüsse von *Pilobolus sphaerosporus* in Dauerlicht und Dauerdunkel. Kurve *I*: 3 Tage Licht (Lichtbeginn 24 Std vor Kurvenbeginn) dann Dauerdunkel (ab 6 Uhr am 3. Versuchstag). Kurve *II*: Dauerdunkel vom Impfen an, dann Dauerlicht (ab 6 Uhr am 3. Versuchstag). Am 6. Versuchstag behielten beide Kurven dieselbe Höhe bei, die sie am Ende des 5. Versuchstags haben.

Abschüsse im Dauerdunkel; ferner etwa 24stündige Rhythmik im Dauerdunkel nach Dauerlicht. Der Grund für diese Verschiedenheit der Ergebnisse ist noch ungeklärt.

Die Vorversuche haben also ergeben: Tagesperiodischem Licht-Dunkelwechsel folgte periodisches Abschleudern auch im anschließenden Dauerdunkel. Einmaliger Wechsel von langer Lichtzeit mit Dauerdunkel löste noch kein periodisches Abschleudern aus.

2. Hauptversuche.

a) Belichtungsversuche.

α) Helldunkelzyklen von 24 Std Gesamtdauer.

Schmidle, der die Sporangienabschüsse alle 3 Std gezählt hat, erhielt im Licht-Dunkelwechsel 12:12 das Abschußmaximum 30 Std nach dem maßgeblichen Lichtbeginn. Die eigenen Vorversuche bei ½stündiger Zählung ergaben das Maximum des Sporangienabschusses von *Pilobolus sphaerosporus* 28—29 Std nach Lichtbeginn. Diese Zeit, die „Entwicklungszeit" genannt sei, wurde bei Herstellung eines künstlichen Langtages von 18:6 Std länger. Das Abschußmaximum lag dann 30 Std nach Lichtbeginn. Der Verlauf der Abschußkurve war sonst entsprechend der im Zyklus 12:12. Bei 21 Std Belichtung und 3 Std Dunkelheit traten zwar noch tägliche Maxima auf, sie waren aber zeitlich nicht mehr so fest fixiert (mittlerer Fehler $\pm$ 18—24 min) und lagen bis zu 33 Std hinter dem Lichtbeginn (3. und 4. Versuchstag in Abb. 4). Zwischen den Maxima an den aufeinanderfolgenden Tagen hörten die Sporangienabschüsse nicht wie bei 12:12 auf, sondern — wie im Dauerlicht — wurden dauernd wenige Sporangien abgeschossen. Die Höhe der Maxima war daher sehr viel geringer als beim Zyklus 12:12. Nur der durch den ersten Lichtbeginn eingeleitete Sporangienabschuß war so stark wie beim Zyklus 12:12.

Bei 23 Std Licht und 1 Std Dunkelheit trat nach dem ersten Maximum, das durch den ersten Lichtbeginn hervorgerufen wurde, überhaupt keine periodische Sporangienträgerbildung mehr auf. Dunkelheit von nur 1 Std Dauer war also nicht ausreichend, um eine periodische Entwicklung hervorzurufen.

Wurde die Lichtzeit auf weniger als 12 Std verkürzt, so lag das Maximum beim Zyklus 9:15 27 Std nach Beginn des Lichtes, bei 4:20 trat es schon nach 25½ Std auf. Der Pilz begann hier schon vor Beginn der Lichtperiode am 2. und allen folgenden Versuchstagen mit dem Abschleudern seiner Sporangien, und das Maximum wurde bereits 1 bis 1½ Std nach Lichtbeginn erreicht. Die Entwicklungszeit bei 1 Std Licht und 23 Std Dunkelheit (Abb. 5) betrug ebenfalls 25½ Std. Das Maximum fiel in diesem Fall in die Dunkelzeit, wenn es auch am Ende der 1 Std Licht schon beinahe erreicht war.

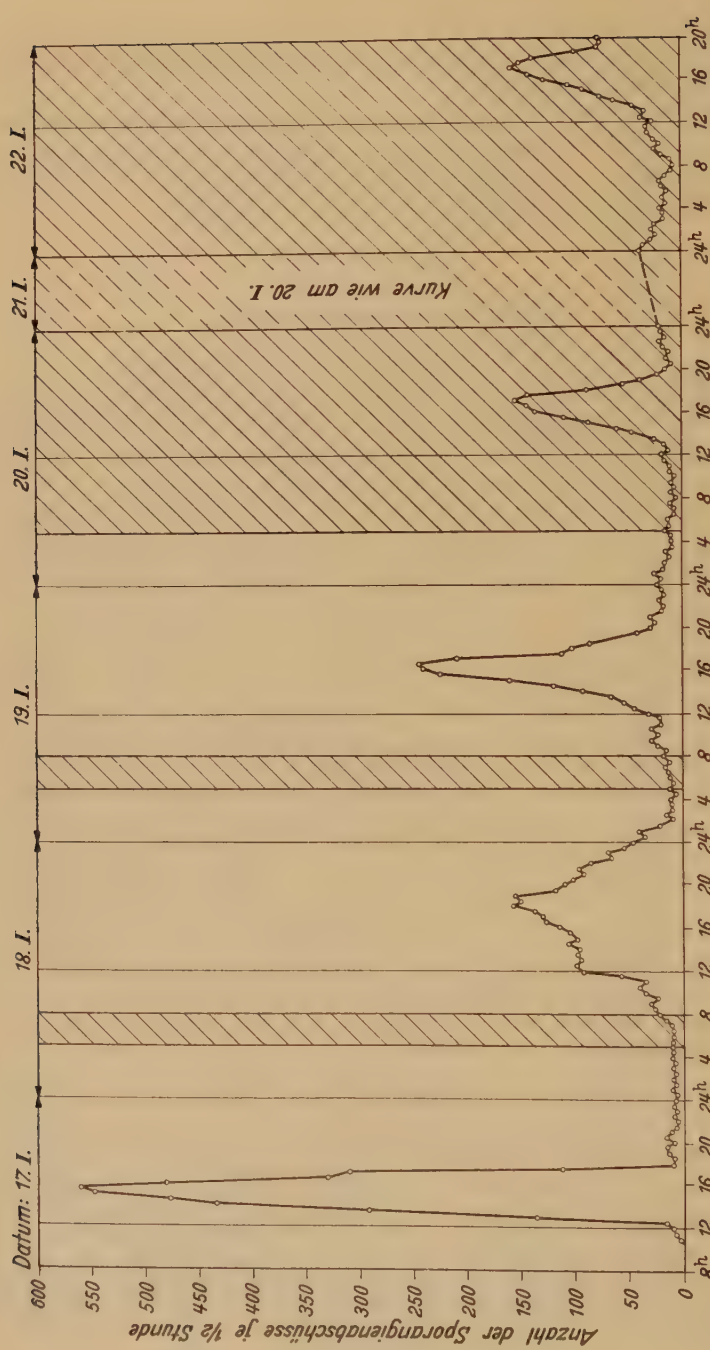


Abb. 4. 21:3stündiger Licht-Dunkelwechsel (*Pilobolus sphaerosporus*). Erster Lichtbeginn am 16. 1. um 8 Uhr. Dunkelstunden schraffiert.

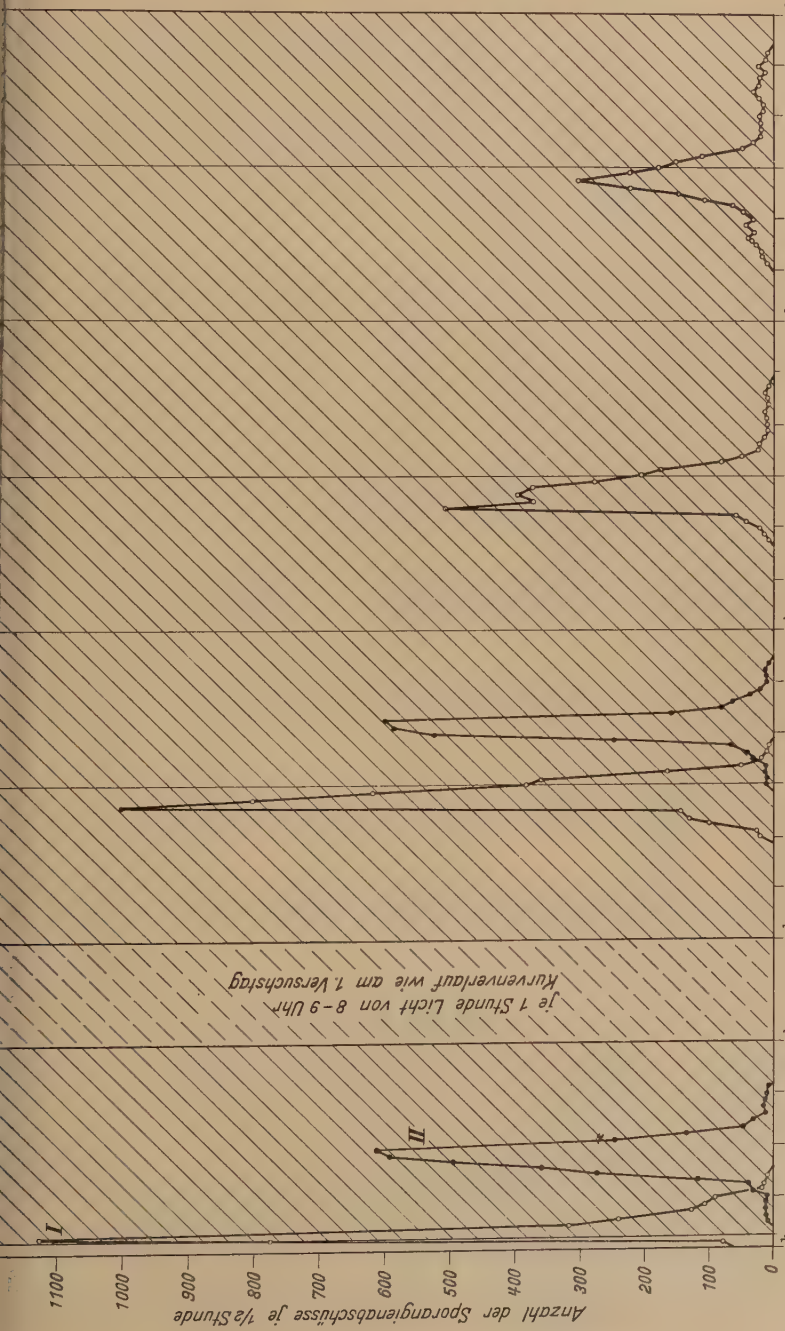


Abb. 5. 1:23stündiger Licht-Dunkelwechsel. Kurve *I*: *Pilobolus sphaerosporus*, Kurve *II*: *Pilobolus crystallinus*. Erste Lichtstunde von 8–9 Uhr am Tag vor Kurvenbeginn.

Die Ergebnisse aller Versuche mit *Pilobolus sphaerosporus* (*Pilobolus crystallinus* s. u.) sind in Abb. 6 zusammengestellt. Die zeitliche Lage der Maxima verschiebt sich mit längeren Lichtzeiten vom auslösenden Lichtbeginn weg nach rechts, die Entwicklungszeit des Pilzes wird also verlängert. Im Dauerdunkel nach dem Licht-Dunkelwechsel war überall (bis auf 23:1) periodisches Abschleudern während drei bis fünf Tagen zu

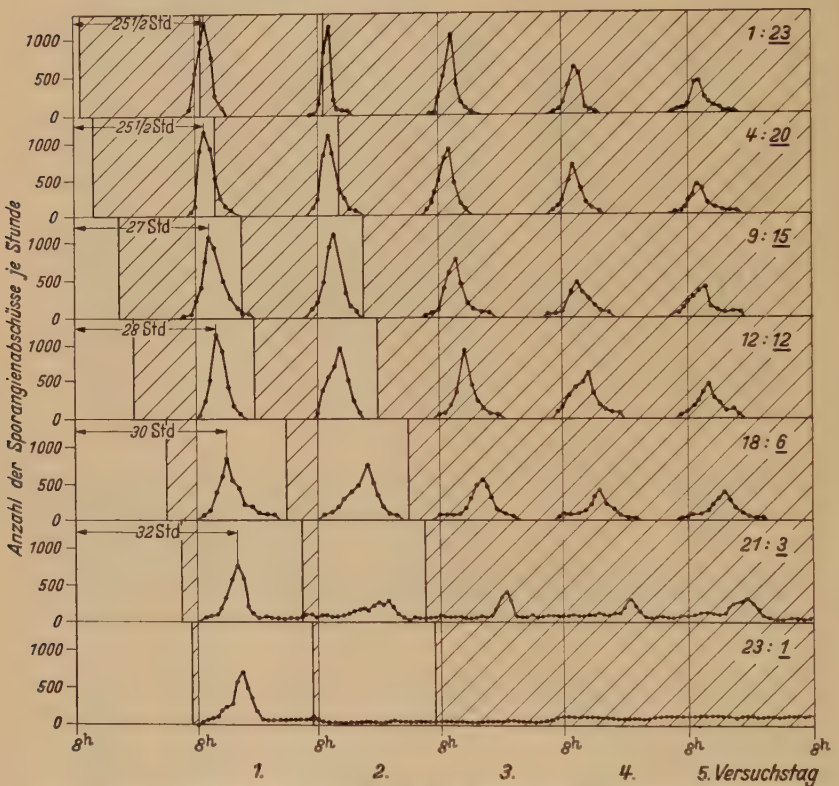


Abb. 6. *Pilobolus sphaerosporus*, Zyklen mit 24 Std Gesamtdauer. Vereinfacht nach vorhandenen Versuchskurven.

beobachten. Die Maxima lagen im Dauerdunkel immer in etwa 24stündigen Abständen voneinander, wie auch die Gipfel der Maxima während der periodischen Beleuchtung 24 Std voneinander entfernt waren, ganz unabhängig von der Entwicklungszeit bei den einzelnen Versuchen. Abb. 6 zeigt außerdem, daß die Abschußfelder mit zunehmender Länge der Lichtzeiten breiter werden, während ihre Höhe sich verringert.

Bei den Licht-Dunkelwechseln 1:23 und 9:15 wurde in Wiederholungsversuchen schon nach zwei bzw. einem Zyklus Dauerdunkelheit angeschlossen. In diesen Fällen traten keine Maxima im Dauerdunkel

mehr auf, sondern nur nach drei- und mehrmaliger periodischer Beleuchtung waren die rhythmischen Erscheinungen im Dauerdunkel noch während drei bis fünf Tagen vorhanden.

Bei *Pilobolus crystallinus*, mit dem teilweise die gleichen Versuche ausgeführt wurden (1:23, 4:20, 9:15, 12:12 und 18:6), waren die Entwicklungszeiten länger, nämlich 30 bis 34 Std. Es traten auch keine so deutlichen Beziehungen zwischen Länge der Lichtzeit und Dauer der Entwicklungszeit auf. Weil diese Art außerdem im Dauerdunkel überhaupt keine Sporangien bildet, wurden die Versuche mit ihr nicht fortgesetzt.

β) Licht-Dunkelzyklen länger als 24 Std (1:47, 2:27 und 12:17).

Zur Klärung der Frage, ob Licht, das auf einen Sporangienträger von *Pilobolus* fällt, das Abschleudern der Sporangien beschleunigt, wie es von Coemans (1861), Buller (1934) und Bünning (1938) angegeben

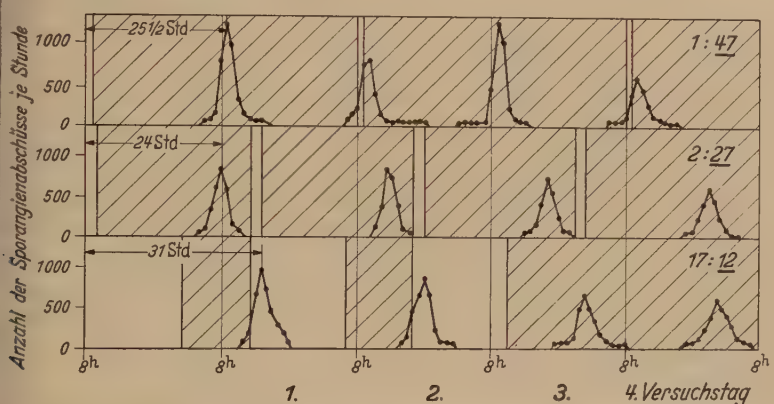


Abb. 7. 1:47-, 2:27- und 17:12stündiger Licht-Dunkelwechsel. Wie alle folgenden Kurven von *Pilobolus sphaerosporus*.

wird, wurden die Pilze dem Wechsel von einer Stunde Licht und 47 Std Dunkelheit ausgesetzt; sie bekamen also nur an jedem zweiten Tag Licht, das dann aber auf fertige Sporangien einwirkte. Die Bedingungen für zwei aufeinanderfolgende Maxima waren also verschieden. Das eine Maximum kam durch die eine Lichtstunde zustande, die am Tag vorher auf die Wurzelblasen eingewirkt hatte, die fertigen Sporangien erhielten aber kein Licht. Das zweite Maximum war ohne Belichtung der Wurzelblasen entstanden; hier bekamen aber nun die fertigen Sporangien eine Stunde Licht. In der zeitlichen Lage der Maxima zeigten sich aber keine Unterschiede (Maxima 25—25½ bzw. 49—49½ Std nach der Belichtungsstunde). Der Abschuß wurde also durch die Belichtung nicht beschleunigt.

Im Zyklus 2:27 zeigte sich dasselbe (Abb. 7). Die Entwicklungszeit des Pilzes verkürzte sich aber auf 23—25 Std; der Pilz schoß also schon lange vor Beginn der neuen Belichtung, erreichte sein Maximum und

beendete das Schießen, ehe die neue Belichtung begann. Zur Beschleunigung des Abschusses war also die Beleuchtung der fertigen Sporangienträger nicht nötig. Die obigen Versuche mit Dauerdunkelheit bestätigen dies, lassen aber, für sich betrachtet, diesen Schluß noch nicht zu, weil ja in dauernder Dunkelheit die Dauer der Entwicklungszeit nicht festgelegt werden kann, die als Zeitdauer vom Lichtbeginn bis zum Abschußmaximum definiert wurde. Die Entwicklungszeit war bei diesem Versuch kürzer als bei allen vorhergegangenen (kürzeste Entwicklungszeit bei 1:23 und 4:20, 25—26 Std). Das könnte so gedeutet werden, daß bei diesem Zyklus, der ja länger als der normale Tageszyklus ist, von dem Pilz in der Entwicklungszeit eine 24stündige Rhythmik angestrebt wird, die sich aber bei den früheren Versuchen gegen die Wirkung der längeren Lichtzeiten nicht durchsetzen konnte. Der Zyklus 17:12 (Abb. 7) spricht auch hierfür: Die Entwicklungszeit war auf 31 Std verlängert, die lange Lichtzeit hatte die Entwicklung wieder gehemmt.

γ) Licht- und Dunkelzeit im Verhältnis 1:1 (18:18 bis 2:2).

Bei einem Licht-Dunkelwechsel von 10:10 Std traten die Maxima 28—29 Std nach Lichtbeginn auf, die Entfernung der Maxima voneinander betrug aber nur 20—22 Std. Die Entwicklung folgte also dem Zyklus 10:10. Nach drei Zyklen wurde Dauerdunkelheit gegeben, das vierte Maximum war daher das letzte, das von einer Belichtung abhängig auftrat. Das fünfte Maximum war dann 24 Std vom vierten entfernt und auch die folgenden Maxima lagen alle etwa 24 Std auseinander. Der Pilz folgte also dem kürzeren Belichtungszyklus nur, solange er ihm direkt ausgesetzt war.

Das Abschleuderergebnis in sieben verschiedenen Zyklen zwischen 18:18 und 4:4 ist in Abb. 8 dargestellt. Die Entwicklungszeit betrug bei allen Versuchen zwischen 28 und 29 Std. Die ersten Maxima liegen fast genau senkrecht untereinander. Das Abschleudern der Sporangien fand während der Lichtzeit, wie bei den Zyklen 12:12, 10:10, 6:6 und 4:4, oder in der Dunkelzeit, wie bei den Zyklen 18:18, 16:16 und 8:8 statt. In allen Fällen leitete der Lichtbeginn die Bildung einer neuen Sporangienträgergeneration ein, das Maximum lag dann 28 bis 29 Std nach diesem Lichtbeginn. Daraus erklärt sich auch, daß im Dauerdunkel noch bis zu 3 (beim Zyklus 4:4) Maxima in den vorangegangenen Abständen folgen konnten und erst dann ein 24stündiger Rhythmus eintrat. Abb. 9 zeigt Teile des Zyklus 4:4 noch einmal, nicht schematisch: Die Maxima lagen 8—9 Std auseinander, die Entwicklungszeit betrug 28—29 Std, und im Dauerdunkel folgten noch drei Maxima im Abstand von 8, $8^1/_2$ und wieder 8 Std, als Folgen eines jeweils 28 Std vorausgegangenen Lichtbeginns; erst das vierte Maximum im Dauerdunkel, das $24^1/_2$ Std vom dritten entfernt war, ist als Nachwirkung aufzufassen.



Abb. 8. 18:18 bis 2:2stündiger Licht-Dunkelwechsel.

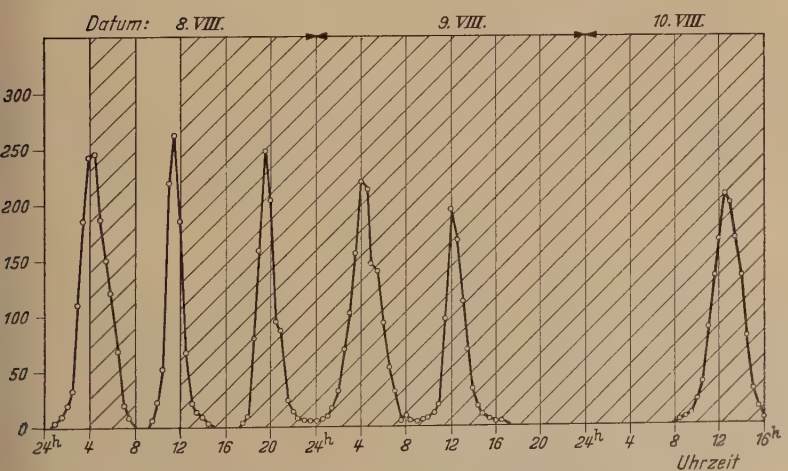


Abb. 9. 4:4stündiger Licht-Dunkelwechsel. Erster Lichtbeginn am 6. 8. um 8 Uhr.

Der Licht-Dunkelwechsel 2:2 zeigte ein ganz neues Bild (Abb. 10). Der Pilz begann 26 Std nach Beginn des Beleuchtungswechsels mit dem Sporangienabschuß; $5^1/_2$ Std danach, also $31^1/_2$ Std nach dem maßgeblichen Lichtbeginn, wurde das Maximum erreicht, dann verminderte sich das Abschleudern langsam. Weiterhin war der Abschuß wie im Dauerlicht, und erst nachdem die periodische Beleuchtung aufgehört und das Dauerdunkel bereits 24 Std eingewirkt hatte, stieg die Abschußzahl zu einem schwachen Maximum an. Es wurden im ganzen noch vier

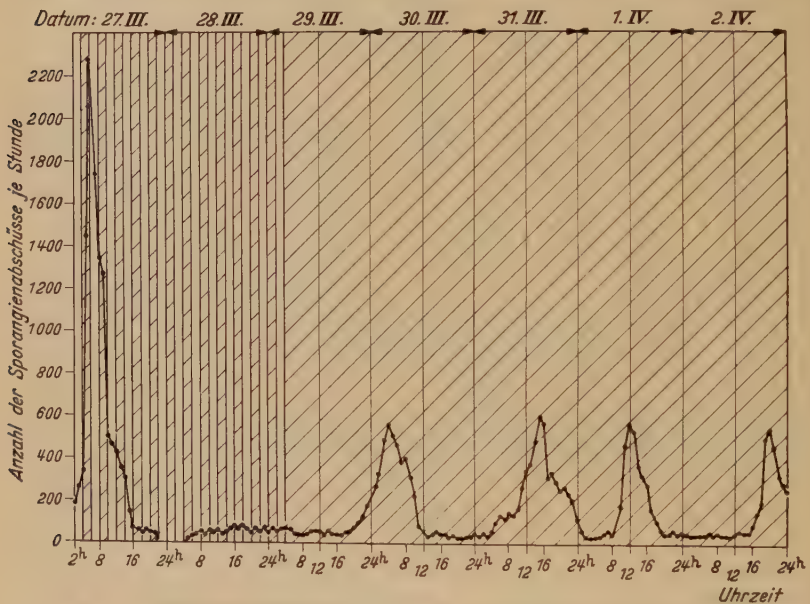


Abb. 10. 2:2stündiger Licht-Dunkelwechsel. Erster Lichtbeginn am 25. 3. um 20 Uhr.

Maxima erreicht, die 26 Std vom Dunkelbeginn entfernt und dann 36, 20 und 30 Std auseinander lagen. Der Pilz konnte also diesem kurzen Licht-Dunkelwechsel nicht mehr folgen und ging erst unter konstanten Bedingungen zu periodischer Sporangienträgerbildung über.

δ) Der Einfluß von Störlicht.

Aus allen bisherigen Versuchen geht hervor, daß *Pilobolus sphaerosporus* im Wechsel einer langen Dunkelperiode mit einer kurzen Lichtperiode besser ausgeprägte Periodizität zeigt als im Wechsel einer kurzen Dunkelperiode mit einer langen Lichtperiode. Vom Licht einmal eingeleitete Vorgänge schienen also im Dunkel weiter abzulaufen und durch Licht verlangsamt zu werden. Inwieweit das Licht hemmend auf die Entwicklungszeit im Dunkeln wirkt, soll durch die nachstehenden Versuche mit „Störlicht", das während kurzer Zeit in der Dunkelzeit gegeben

wurde, aufgeklärt werden. HARDER und BODE (1943) u. a. haben an Blütenpflanzen entsprechende Untersuchungen vorgenommen.

In dem Licht-Dunkelwechsel 9:15 wurde während der Dunkelheit eine Stunde Licht eingeschaltet und zwar in der 3., 5., 6., 9. und 12. Std der Dunkelperiode (Abb. 11). Ohne Störlicht (oberste Kurve) lag das Maximum 27 Std nach Lichtbeginn. Bei Versuch 1 — Störlichteinsatz 3 Std nach Dunkelbeginn — lag das Maximum erst 30—30½ Std nach Beginn jeder 9stündigen Lichtzeit. Die Entwicklungszeit war also verlängert. Im Versuch 2 mit Störlicht nach 5 Std Dunkelheit lagen die Verhältnisse ähnlich. Bei Störlicht 6 Std nach Dunkelheitsbeginn (Versuch 3) zeigte die Kurve vom 2. Maximum ab nicht mehr ihren typischen Verlauf: Der maximale Sporangienabschuß erstreckte sich über 4—5 Std mit je rund 200 Sporangienabschüssen in jeder halben Stunde (im Normalfall maximaler Abschuß etwa 1000 und zudem auf nur ½—1 Std konzentriert); der Gipfel der Kurve wurde also breit und niedriger. Das Störlicht lag hier etwa in der Mitte der Dunkelzeit. Rückte es weiter gegen deren Ende, so verkürzte sich die Entwicklungszeit bei Versuch 4 auf 26 Std und bei Versuch 5 auf 25½ Std. Bei diesen letzten beiden Versuchen ist also anscheinend eine Beschleunigung der Entwicklung eingetreten. Man kann aber auch annehmen, daß das kurz vor Lichtbeginn einsetzende Störlicht bereits wie der Lichtbeginn selbst wirkte und die relativ kurze Dunkelperiode von 2 bzw. 5 Std zwischen Störlicht und Hauptlicht gar keinen Einfluß mehr hatte. Nimmt man den Beginn der Entwicklungszeit beim Störlichtbeginn an, so beträgt die Entwicklungszeit 29 bzw. 32 Std. Das entspricht einer Entwicklungszeit, die man erhält, wenn man Störlicht und anschließende kurze Dunkelperiode zum nachfolgenden Hauptlicht addiert. Dann läge auch hier eine hemmende Wirkung des Lichtes vor.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Versuche mit der Reaktion von *Pilobolus* auf Kurzzyklen (4:4 und 6:6) und auf den Zyklus 1:23, so erhebt sich die Frage, warum das etwa in der Mitte der Dunkelzeit liegende Störlicht nicht die Bildung einer neuen Sporangienträgergeneration hervorrief. Denn 1 Std Licht sowie die Anzahl der vorhergehenden und folgenden Dunkelstunden würden dafür nach den in Abb. 5 und Abb. 8 wiedergegebenen Verhältnissen ja genügen. Die Vermutung lag nahe, daß das Störlicht deshalb keine neue Sporangienträgergeneration erzeugen kann, weil ein bestimmtes Verhältnis im Wechsel und in der Länge der Lichtzeiten und Dunkelzeiten herrschen muß. Die Annahme wurde bestätigt durch zwei weitere Versuche im Zyklus 6:18 mit 3stündigem Störlicht (die beiden unteren Versuche in Abb. 11). Wenn das 3stündige Störlicht 3 Stunden nach Dunkelheitsbeginn, also am Anfang der Dunkelperiode, gegeben wurde, verzögerte sich das Maximum bis zu 31 Std nach Hauptlichtbeginn. Es trat also wieder eine Summation der beiden Lichtzeiten ein, wobei die dazwischenliegende Dunkel-

zeit unwirksam war. Lag aber das Störlicht etwa in der Mitte der Dunkelperiode, so wirkte es nun wie ein neuer Lichtbeginn: es regte die Bildung einer neuen Generation von Sporangienträgern an.

Das Störlicht mußte also nach Lage und Zeitdauer ein bestimmtes Verhältnis zur Hauptlichtzeit haben; dauerte es halb so lang wie die Lichtperiode, so wirkte es „störend", wenn es am Anfang der langen Dunkelperiode lag; in der Mitte der Dunkelperiode gelegen, rief es bei derselben Länge neue Sporangienträgerbildung hervor.

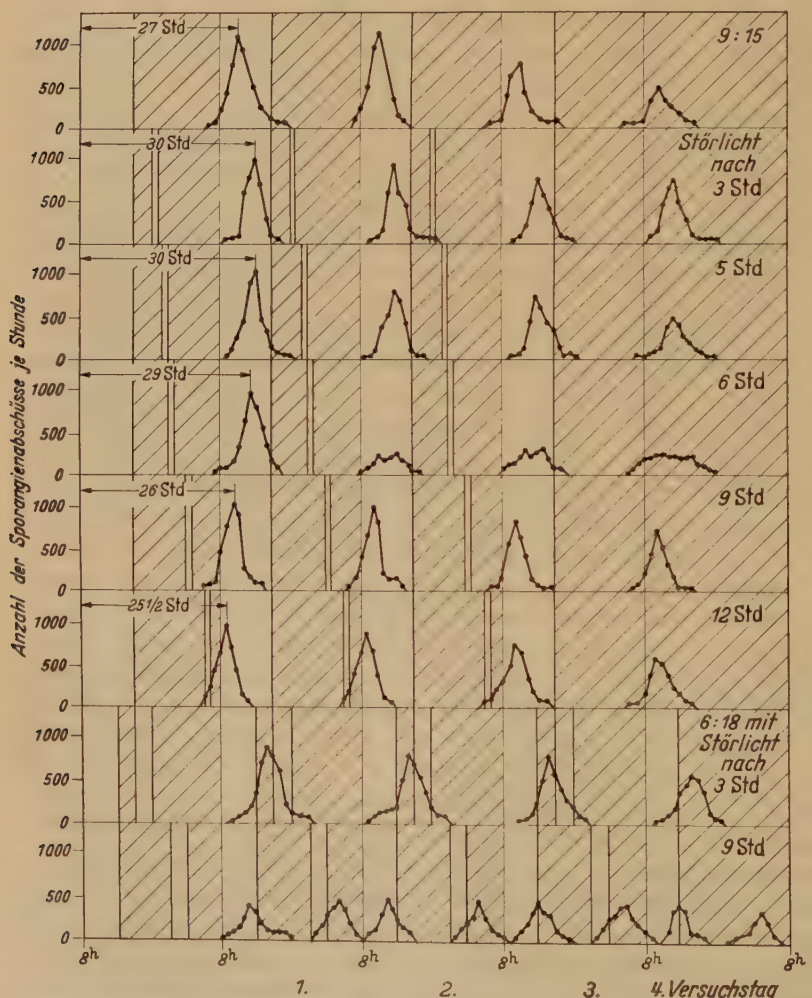


Abb. 11. 9:15stündiger Licht-Dunkelwechsel mit 1 Std Störlicht zu verschiedenen Zeiten in der Dunkelperiode und 6:18stündiger Licht-Dunkelwechsel mit 3 Std Störlicht am Anfang bzw. in der Mitte der Dunkelperiode.

ε) Einfluß des Lichts auf die Menge der gebildeten Sporangienträger.

Um die in den Vorversuchen mit Dauerlicht und Dauerdunkel bereits erkennbare hemmende Wirkung des Lichts auf die Zahl der ausgebildeten Sporangienträger näher zu verfolgen, wurden bei allen im Laufe der Arbeit in den Lichtzyklen 1:23 bis 23:1 gemachten Versuchen die täglich abgeschossenen Sporangien für jeden Zyklus an drei aufeinanderfolgenden Versuchstagen zusammengezählt. Dabei ergab sich (Tab. 1), daß die Zahl der täglichen Abschüsse mit verlängerter Lichteinwirkung immer geringer wurde.

Tabelle 1. *Absolute Gesamtzahl der an 3 aufeinanderfolgenden Versuchstagen abgeschossenen Sporangien in den Zyklen 1:23 bis 23:1* (aus 2 Wiederholungsversuchen).

Zykl.	1:23	4:20	6:18	9:15	12:12	15:9	21:3	23:1	Summe
1. Tag	30547	30378	27506	29067	29421	27182	11329	15204	200634
2. Tag	28432	25806	28919	25839	25321	17518	7850	1540	161225
3. Tag	25554	18251	24160	23994	23174	14122	7287	2093	138635
Summe	84533	74435	80585	78900	77916	58822	26466	18837	

Tabelle 2. *Varianzschema für die Zyklen in Tab. 1.*
F = FISHER-Faktor, s^2 = Summenquadrat, *** = höchster Grad der Signifikanz.

Bestandteil der Streuung	Summe der Abweichungsquadrate	Freiheitsgrad	s^2	s^2/s^2_R	F 0,06	F 0,01	F 0,001
Zyklus	153437466,6	7	21919638	535***	2,05	2,73	3,64
Tag	16993075,7	2	8496538	207***	3,04	4,71	7,14
Wechs.wirk. Zyklus - Tag	10869867,7	14	776419	18,9**	1,74	2,17	2,73
Rest	8857685,0	216	41008	—	—	—	—
Gesamt	179230438,2	239	750000	—	—	—	—

Um ein sicheres Urteil darüber zu bekommen, ob diese Ergebnisse nicht durch Zufallsstreuung zustande kamen, wurden sie durch Varianzanalyse (nach FISHER, 1925, SNEDECOR, 1950 und BRETTSCHNEIDER, 1952) gesichert. Die Varianzanalyse gestattet es, mehrere auf das Ergebnis Einfluß nehmende Faktoren bei der Auswertung einzubeziehen. Die Streuung wird zerlegt, und sie wurde in diesem Fall auf die beiden Gruppen „Zyklus" und „Tag" verteilt. In der Gruppe „Zyklus" wurde die Länge der Lichtzeit, in der Gruppe „Tag" der Einfluß des Alters der Kultur (Umsetzung und Erschöpfung des Substrats) in ihrer Wirkung auf die zahlenmäßige Sporangienträgerentwicklung untersucht. Durch das Rechenschema der Varianzanalyse wurde außerdem die Wechselwirkung der beiden Gruppen festgestellt. Das Ergebnis zeigt, daß trotz der täglichen Abnahme der Sporangienabschüsse, also der eingetretenen Ermüdung, die der Umsetzung des Substrats entsprechen dürfte, das Licht eine hemmende Wirkung auf die Zahl der ausgebildeten Sporangienträger hatte (Tab. 2). Dieser Effekt war hochsignifikant und lag weit über der Zufallsstreuung, so daß sicher ist, daß durch lange Lichtzeit nicht nur die Dauer der Entwicklungszeit verlängert, sondern auch die Zahl der Sporangien vermindert wird.

In Tab. 3 sind einige Zyklen im Licht-Dunkelverhältnis 1:1 dargestellt mit den Abschußzahlen in gleichen Zeiteinheiten (in diesem Fall nicht Tage, denn die verschiedenen Zykluslängen gestatten eine solche Gruppierung nicht). Die Zahl der Sporangienabschüsse entsprach bei diesen Zyklen etwa dem Verhältnis wie beim Zyklus 12:12. Beim Zyklus 6:6 wurden in jeder Generation etwa die Hälfte der Sporangienträger gebildet; die beiden Generationen ergaben aber zusammen ungefähr dieselbe Zahl

Tabelle 3. *Gesamtzahlen der in 60 Std abgeschleuderten Sporangien in einigen Zyklen von 4:4 bis 16:16* (in je 2 Wiederholungsversuchen).

60 Std 4:4	(≈ 8 Zyklen)	66429
60 Std 6:6	(5 Zyklen)	76773
60 Std 8:8	(≈ 4 Zyklen)	71818
60 Std 10:10	(3 Zyklen)	74897
60 Std 12:12	(≈ 3 Zyklen)	77916
60 Std 16:16	(≈ 2 Zyklen)	69889

wie eine Generation im Zyklus 12:12. Entsprechend waren in drei Generationen im Zyklus 4:4 etwa gleichviel Sporangienträger wie bei 12:12 gebildet worden. Die Höhe der Kurve in Abb. 12 läßt das auch schon erkennen. Es bestand also eine Proportion zwischen der Anzahl der täglichen Intervalle von Licht- und Dunkelwechsel und der Zahl der Sporangienabschüsse während jedes einzelnen Intervalls.

ζ) Die Wirkung schwacher Lichtreize von verschiedener Dauer und Intensität.

Die kürzeste Lichtzeit betrug bei den vorstehenden Versuchen eine Stunde. Sie wurde im folgenden auf Sekunden und Bruchteile von Sekunden herabgesetzt. Die Pilze erhielten einmal innerhalb 24 Std $^1/_{10}$ bzw. $^1/_{100}$ bzw. $^1/_{200}$ sec Licht von 100 Lux. In allen drei Fällen traten periodische Reaktionen bei den Pilzen ein (Abb. 12). Vor allem die Belichtung von $^1/_{10}$ sec löste ein sehr starkes Abschießen von Sporangien mit einem Maximum 33 Std nach der Belichtung aus. Bei $^1/_{100}$ sec war das Maximum auch noch sehr ausgeprägt, aber weniger hoch und trat erst nach 36 Std auf. Bei $^1/_{200}$ sec war es zwar noch vorhanden, aber wesentlich undeutlicher und lag auch etwa 36 Std nach dem Lichtblitz; die Kurve am 1. und 2. Versuchstag hatte allerdings einen so breiten Rücken, daß das Maximum auch noch etwas später liegen könnte.

Wurde die Lichtintensität auf 1000 Lux erhöht, so traten die Maxima früher auf, nämlich nach 33 Std bei Belichtung mit $^1/_{200}$ sec und nach 30 Std bei Belichtung mit $^1/_{100}$ bzw. $^1/_{10}$ sec.

In einer anderen Versuchsgruppe wurde die Belichtungsdauer auf 1 sec erhöht und die Lichtintensität variiert: 1500; 10; 1; 0,5; 0,3 und

0,1 Lux. Bei 1500 Lux verlief die Kurve ebenso wie in Parallelversuchen mit Belichtungen von der gleichen Intensität während einer Stunde. Das Maximum trat nach $25^1/_2$ Std auf. Bei 10 Lux während einer Sekunde wurde die Entwicklungszeit aber schon auf 30 Std erhöht. Bei den schwächeren Lichtintensitäten wurden die Kurven sehr flach (Abb. 13) und die Maxima waren umso weniger ausgeprägt, je geringer die Lichtintensität war. Bei 0,1 Lux und einer Sekunde war überhaupt keine Periodizität der Entwicklung mehr zu erkennen; die Pilze schleuderten wie im Dauerdunkel fortwährend Sporangien ab. Die Entwicklungszeit war noch mehr hinausgezögert: Die Maxima der Abschüsse lagen bei

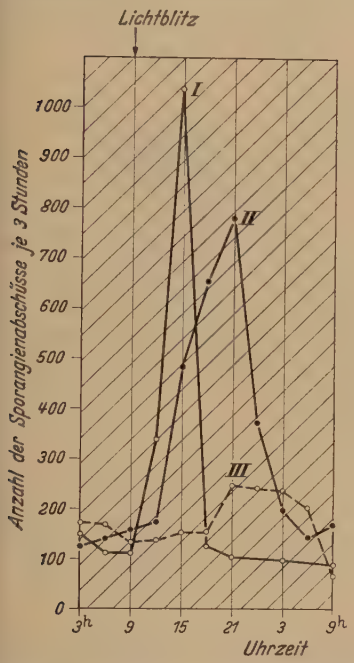


Abb. 12. Lichtblitze bei einer Lichtintensität von 100 Lux. Kurve *I*: $^1/_{10}$ sec, Kurve *II*: $^1/_{100}$ sec, Kurve *III*: $^1/_{300}$ sec.

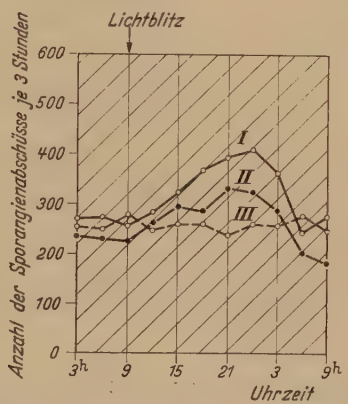


Abb. 13. Lichtblitze von 1 sec bei einer Beleuchtungsintensität von 1 Lux in Kurve *I*, 0,3 Lux in Kurve *II* und 0,1 Lux in Kurve *III*.

Erster Lichtblitz 24 Std vor dem hier eingetragenen Lichtblitz. Ausschnitte aus vorhandenen Versuchskurven.

1, 0,5 und 0,3 Lux 36 Std nach dem Lichtblitz. Eigenartigerweise steigerte sich die Höhe des Maximums bei 1 Lux nach mehrmaliger Einwirkung wesentlich, ohne daß ein Grund dafür ersichtlich gewesen wäre.

In Tab. 4 sind alle Ergebnisse der Versuche mit verschiedenen Lichtintensitäten bei verschiedenen Einwirkungszeiten zusammengefaßt. Es zeigt sich, daß die günstigste Wirkung des Lichts bei 1 sec mit 1500 Lux beginnt, die Entwicklungszeit beträgt dort nur 26 Std. Bis zu einer vierstündigen Einwirkungsdauer von 1500 Lux (wie aus früheren Versuchen hervorgeht) bleibt die Entwicklungszeit 26 Std, dann steigt sie auf 29 Std an. Wenn bei größenordnungsmäßig gleichen Beleuchtungsinten-

Tabelle 4. *Entwicklungszeiten (in Stunden) bei verschiedenen Lichtintensitäten und verschiedenen Lichtzeiten. Darunter Lichtmenge in Luxsekunden (kursiv).*

Beleuchtungsintensität	Belichtungszeit									
		1/200 sec	1/100 sec	1/10 sec	1 sec	10 sec	30 sec	60 sec	3600 sec	3 Std	12 Std
	Lux				26		26		26	26	29
	1500				*1500*		*45000*		*5400000*	*16 Mill.*	*64 Mill.*
	1000	33	30	30							
		5	*10*	*100*							
	100	36	36	33							
		0,5	*1*	*10*							
	35									27—30	
										378000	
	10				30			27		30	
					10			*600*		*108000*	
	3									30	
										32400	
	1				36				30	30	
					1				*3600*	*10800*	
	0,5				36	33					
					0,5	*5*					
	0,3				36	33					
					0,3	*3*					
	0,1				keine Periode	36				33	33
					0,1	*1*				*1080*	*43200*

sitäten kürzer als eine Sekunde belichtet wird, verlängert sich die Entwicklungszeit auf 30—33 Std und bei Herabsetzen der Beleuchtungsintensität auf 100 und weniger Lux sogar bis auf 36 Std.

Die Ergebnisse der Tabelle lassen sich am besten durch eine graphische Darstellung ausdrücken (Abb. 14). Verbindet man in einem Koordinatensystem (Abszisse: Belichtungszeit, Ordinate: Lichtintensität) alle eingezeichneten Punkte gleicher Entwicklungszeiten durch umfassende Linien, so liegen die längsten Entwicklungszeiten (36 Std) in einem Felde etwa um das Gebiet von 1 Luxsekunde (linke Ecke der Abbildung). Die Entwicklungszeiten von 33 Std liegen etwa im Gebiet um 10 Luxsekunden, sie fallen bei niederen Intensitäten aber aus der Reihe und reichen in das Gebiet von 1000 Luxsekunden hinein. In noch stärkerem Maße ist das bei 30 Std Entwicklungszeit der Fall, die von 10 Luxsekunden bis 100000 Luxsekunden bei absinkender Intensität und wachsender Zeit hinüberreicht. Die optimalen Entwicklungszeiten sind alle im Bereich der Lichtintensitäten von 1000 und 1500 Lux, und erst wenn diese Inten-

sitäten längere Zeit (mehr als 4 Std) einwirken, macht sich der hemmende Einfluß des Lichtes bemerkbar.

Zwischen 0,1 und 100 Luxsekunden nimmt also die Entwicklungszeit in großen Zügen mit zunehmender Belichtungsmenge ab und ist bei den höheren Lichtmengen im allgemeinen kurz, sofern die angewandte Lichtintensität stark ist; bei schwächeren Intensitäten kommt es aber zu Verzögerungen, entweder infolge der bei diesen Intensitäten erforderlichen Belichtungszeiten oder aber wegen der Schwäche des Lichtreizes selbst.

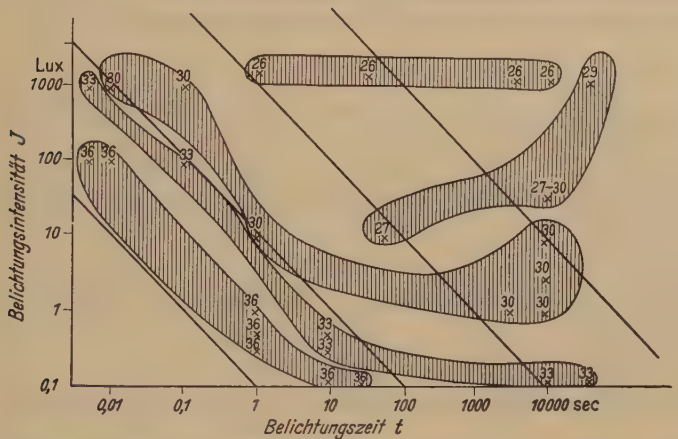


Abb. 14. Entwicklungszeiten (in Stunden) in Abhängigkeit von der Lichtmenge (Luxsekunden). Die Bereiche gleicher Entwicklungszeiten sind zu Feldern zusammengefaßt. Intensität und Zeit beide logarithmisch aufgetragen. Geraden gleicher Lichtmengen laufen unter 45°.

b) Temperaturversuche.

Die ersten Versuche sollten zur Orientierung dienen, in welchem Temperaturbereich überhaupt Sporangienträger erzeugt werden. Die genaue untere Grenze wurde nicht ermittelt; sie liegt zwischen + 11° und + 15° C, bei 11° traten keine Sporangien mehr auf, bei 15° wurden sie dagegen schon sehr üppig entwickelt. Die obere Grenze lag bei etwa 30° C.

Kulturen, die dauernd derartig hohen Temperaturen ausgesetzt wurden, bildeten stark degenerierte Sporangienträger: sie blieben sehr klein und die Membran ihres Sporangiums war nicht schwarz, sondern gelblich bis braun; sie schleuderten ihre Sporangien auch nur noch selten ab, meist sank der ganze Träger nach der Sporangienreife in sich zusammen und das Sporangium lag auf dem Substrat, noch fest mit der subsporangialen Blase verbunden (vgl. Palla, 1900).

Die weiteren Versuche galten der Frage, ob Temperaturerhöhung periodische Sporangienträgerbildung auslösen kann. Erhöhung um 1° C während täglich 12 Std rief im Dauerdunkel keine Periodizität hervor, Temperaturwechsel um 5° C (also 12 Std bei 15°, 12 Std bei 20°) führte jedoch zu periodischem Abschleudern der Sporangien. (Schmidle hatte

bei seinen beiden in der Einleitung erwähnten Temperaturversuchen bei Temperaturerhöhung um 4° C Periodizität gefunden.)

Die ersten Versuche wurden bei einer Grundtemperatur von 15° C gemacht. Aus technischen Gründen konnte die Temperaturerhöhung sich nur über eine Stunde erstrecken. Die Dunkelkulturen wurden also 23 Std bei 15° gehalten, und dann wurde im ersten Versuch die Temperatur an drei Tagen während einer Stunde auf 20° erhöht. Diese eine Stunde Temperaturerhöhung um 5° war ausreichend (Abb. 15), periodische Sporangienträgerentwicklung hervorzurufen. Zwar findet man bei der Grundtemperatur von 15° C im Dunkeln einen dauernden Ab-

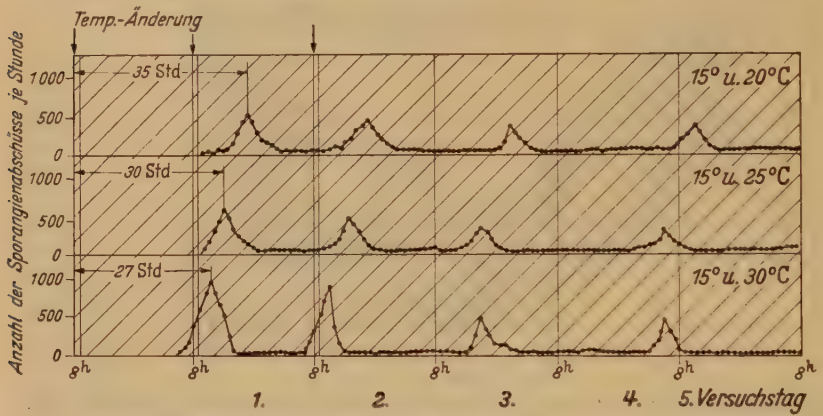


Abb. 15. Einstündige Temperaturerhöhung von 15° C auf 20° C, 25° C und 30° C. Grundtemperatur 15° C.

schuß von Sporangien, aber die durch die Temperaturerhöhung ausgelösten Maxima waren doch sehr deutlich; sie lagen 33—36 Std nach der Temperaturerhöhung. Nach Beendigung der täglichen Erwärmung dauerte das periodische Schießen noch zweimal an, dann folgte wieder unperiodisches Abschleudern der Sporangien. Die Lage der beiden letzten Maxima bei konstanter Temperatur von 15° zeigte noch etwas Neues, sie waren nämlich 36 Std voneinander entfernt, während alle vorhergehenden Versuche, die bei 22° C ausgeführt worden waren, im Dauerdunkel eine etwa 24stündige Periodizität gezeigt hatten, ganz gleichgültig, wie lange vorher, vom Licht abhängig, die Entwicklungszeit gewesen war. Diese Abweichung kommt vermutlich daher, daß die niedrige Temperatur die Gesamtentwicklung des Pilzes verlangsamt hatte.

Bei den beiden nächsten Versuchen (Abb. 15), die ebenfalls bei 15° C Grundtemperatur und mit einer Reiztemperatur von 25° C bzw. 30° C angestellt wurden, war die Periodizität in der folgenden Zeit konstanter Temperatur auch auf 36 Std erhöht. Während des rhythmischen Temperaturwechsels aber lagen die Maxima nur 24 Std voneinander entfernt.

Die einstündige Temperaturerhöhung, die zu Beginn und am Ende der Entwicklung je einmal einwirkte, beschleunigte den gesamten Ablauf der Entwicklung also so stark, daß sie dem 24stündig induzierten Rhythmus folgen konnte. Die graphische Darstellung in Abb. 15 zeigt außerdem, daß die Entwicklung umso mehr beschleunigt wird, je größer die Temperaturerhöhung ist. Auch zeigte es sich, daß 30° C, wenn sie nur eine Stunde täglich einwirkten, keine Degenerationserscheinungen hervorriefen; die Ausbildung der Sporangien war normal.

Bei 20° C Grundtemperatur und einstündiger Erhöhung auf 25° und 30° C (Abb. 16) zeigt sich die stärkste Verkürzung der Entwicklungszeit,

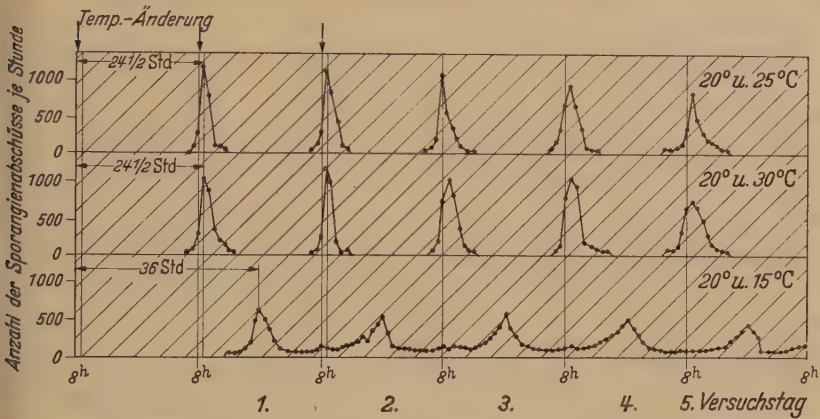


Abb. 16. Einstündige Temperaturerhöhung von 20° C auf 25° C und 30° C und einstündige Temperaturerniedrigung von 20° C auf 15° C. Grundtemperatur 20° C.

die bisher in Erscheinung trat. Sie betrug nur $24^1/_2$ Std; das Maximum fiel immer genau in die Mitte der einstündigen Temperaturerhöhung. Die Temperaturwechsel riefen nachwirkend noch bis zu drei Maxima hervor, die alle 24—25 Std auseinander lagen. Bei einem weiteren Versuch mit 20° C als Grundtemperatur wurde die Temperatur auf 15° C gesenkt. Auch dadurch wurde (Abb. 16) periodisches Schießen ausgelöst. Die Entwicklungszeit betrug 33—36 Std, und die Maxima waren relativ niedrig bei ziemlich reichlichem Dauerabschuß von Sporangien. Die Periodizität unter konstanten Bedingungen im Dauerdunkel war wieder 24stündig.

Versuche mit 25° C Grundtemperatur (Abb. 17) im Wechsel mit 15° und 20° C ergaben ein entsprechendes Bild. Die Maxima waren etwa 33 Std vom Beginn der Temperaturerniedrigung entfernt und lagen unter sich etwa 24 Std auseinander. Bei Temperaturerhöhung von 25° auf 30° C waren die Ergebnisse entsprechend denen bei Erhöhung von 20° auf 30° C.

Es fragte sich nun, ob bei den Versuchen mit einstündiger Temperaturerniedrigung wirklich die Abkühlung die entscheidende Rolle spielte,

oder ob nicht die Wiedererwärmung nach der einstündigen Abkühlung die periodische Entwicklung veranlaßte. Da bei meinen Versuchen, im Gegensatz zu Schmidle, weder einmaliger Lichtwechsel noch einmaliger Temperaturwechsel zu rhythmischen Erscheinungen führte, konnte ein Vergleich zwischen einmaliger Temperaturerhöhung und einmaliger Temperaturerniedrigung keinen Aufschluß über diese Frage geben. Dagegen läßt das Verhalten beim 12stündigen Wechsel von höherer und niedrigerer Temperatur vermuten, daß nur die Temperaturerhöhung ein gemeinsames Auswachsen der Wurzelblasen hervorruft. Sonst müßten ja in diesem Wechsel zwei Generationen von Sporangienträgern gebildet

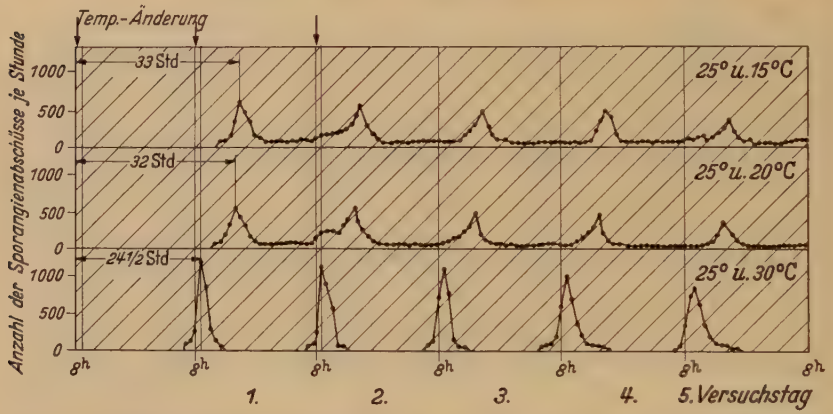


Abb. 17. Einstündige Temperaturerniedrigung von 25° C auf 15° C und 20° C und einstündige Erhöhung von 25° C auf 30° C je dreimal durchgeführt (↓). Grundtemperatur 25° C.

werden, die eine hervorgerufen durch die Erwärmung und die zweite, 12 Std später, durch die Abkühlung. Dies war aber nicht der Fall.

Daß es trotzdem möglich ist, zwei Sporangienträgergenerationen innerhalb 24 Std auch durch Temperaturreize zu erhalten (entsprechend dem Zyklus 6:6 beim Licht-Dunkelwechsel) zeigte ein Versuch mit zweimaliger täglicher Temperaturerhöhung während einer Stunde von 20 auf 30° C (Abb. 18). Hier traten zweimal täglich Maxima auf, die wieder, wie bei der täglich einmaligen Temperaturerhöhung, in der Mitte der einen Stunde Erwärmung lagen. Auch hier wurde, wie bei den Versuchen mit Licht, die anschließende Periodizität, nachdem kein Reiz mehr vorlag, 24stündig.

Die Verhältnisse entsprechen also durchaus denen bei Lichteinwirkung. Der Beginn der Temperaturerhöhung war entscheidend. Wirkte die erhöhte Temperatur nur kurz ein, wurde die Entwicklungszeit abgekürzt; wirkte sie lange ein, wie bei den Versuchen mit einer Stunde Abkühlung, so wurde die Entwicklungszeit verlängert und die Ausbildung stark ausgeprägter Maxima vermindert, wie es bei Versuchen mit

langen Lichtzeiten (21 Std) auch der Fall war, jedoch mit dem Unterschied, daß eine Stunde Dunkelheit nicht mehr zur Ausbildung rhythmischer Erscheinungen ausreichte.

Blickt man noch einmal auf die Versuche mit der Grundtemperatur 15° C zurück, bei denen die Gesamtentwicklung der Sporangienträger stark verzögert war, so könnte man annehmen, daß die Entwicklung bei höherer Temperatur beschleunigt würde. Eine Abkürzung der Entwicklungszeit unter 24 Std trat aber nicht ein, auch bei 25° C Grundtemperatur betrug sie nicht weniger als bei 20° C.

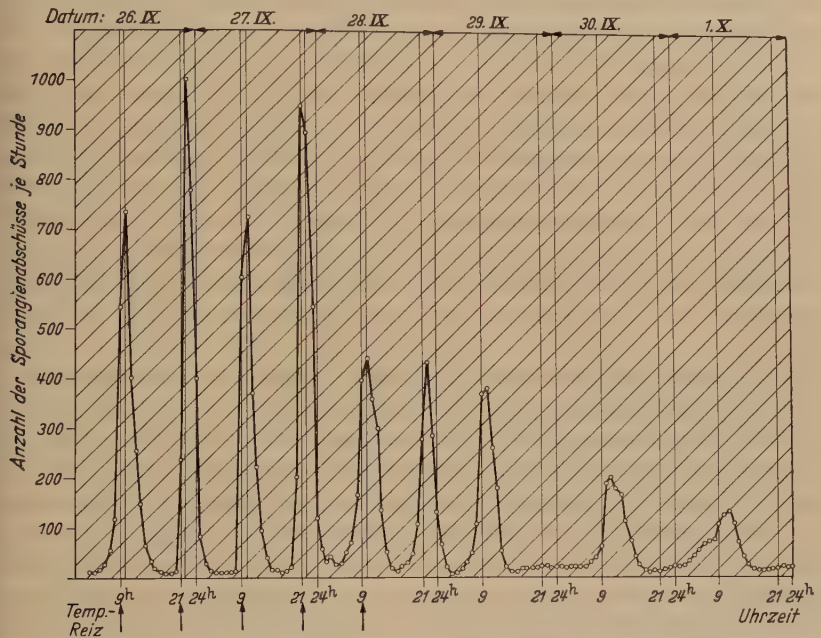


Abb. 18. Einstündige Temperaturerhöhung von 20° C auf 30° C zweimal täglich (alle 12 Std). Erste Temperaturerhöhung am 25. 9. um 9 Uhr, letzte am 28. 9. von 9—10 Uhr.

II. Besprechung der Ergebnisse.

Die vorstehenden Untersuchungen zeigen, daß die Sporangienträgerbildung von *Pilobolus sphaerosporus* in weitgehendem Maße von Umweltsfaktoren gesteuert wird. Da Licht- und Temperaturreize viel stärker wirksam sind als innere Faktoren, ist es oft schwer, einen endonomen Charakter der Rhythmik zu erkennen.

Nach Pfeffer (1915) und Bünning (1932) ist ein Vorgang endonom, der auch dann periodisch verläuft, wenn der auslösende Reiz nicht mehr periodisch vorliegt, oder wenn er sich nicht jedem beliebig kurzen Beleuchtungsrhythmus anpaßt, sondern ihm nur bis zu einer für die verschiedenen Arten spezifischen unteren Grenze folgt und, wenn diese überschritten wird, in den angenäherten 24-Std-

Rhythmus zurückfällt (Pfeffer, 1915, Stoppel, 1916, Bünning, 1932, Kleinhoonte, 1932, Flügel, 1949, und Bünsow, 1953).

Für *Pilobolus sphaerosporus* hat Schmidle (1950) gefunden, daß in konstanter Dunkelheit, die auf periodische Licht- oder Temperaturwechsel folgte, endonome Faktoren zum Ausdruck kamen. Er hat die Lichtzyklen 12:12, 15:15, 6:6 und 3:9 untersucht und hat in Übereinstimmung mit den obigen Ergebnissen im Dauerdunkel 24stündiges periodisches Sporangienabschießen bekommen, während in der vorangegangenen rhythmischen Beleuchtung jeder Lichtbeginn die Bildung einer Sporangienträgergeneration auslöste. Auch schon nach einmaliger längerer (72 Std) oder kürzerer (bis zu 9 Std) Einwirkung von Licht beobachtete Schmidle ebenfalls periodische Sporangienabschüsse im Dauerdunkel. Dies Verhalten war bei keinem der in dieser Arbeit verwandten Stämme zu reproduzieren. Um periodische Sporangienbildung im Dauerdunkel zu bekommen, mußte an 3 hintereinanderfolgenden Tagen mindestens einmal täglich ein Reiz vorgelegen haben. Auch war die Reaktion des Schmidleschen Stammes auf Licht grundsätzlich anders: Im Licht wurden viel mehr Sporangien gebildet als in der Dunkelheit. Im großen ganzen aber lassen sich die hier gefundenen Tatsachen mit den Ergebnissen von Schmidle gut in Einklang bringen.

Ein Vergleich tagesperiodischer Vorgänge bei *Pilobolus* mit den rhythmischen Erscheinungen höherer Pflanzen ist deshalb schwierig, weil man reversible Erscheinungen des Formwechsels mit Perioden der Formbildung oder Entwicklung vergleichen muß. Auch wenn man von der Bewegungsrhythmik der Blütenpflanzen absieht und elementare periodische Vorgänge in der Zelle betrachtet, z. B. Änderung der Acidität (Bünning, 1932), der Fermenttätigkeit (Ehrenberg, 1950), der Atmung (Schmitz, 1951) oder der Plastidenform (Busch, 1953), lassen sich keine direkten Parallelen ziehen.

Die täglich neue Periode der Formbildung erinnert eher an die Fruchtkörperbildung anderer Pilze. Bei *Coprinus*, *Pyronema* u. a. ist z. B. die Fruchtkörperbildung von Licht, Temperatur oder mechanischen Reizen abhängig (Stiefel, 1952, Vorderberg, 1949, Bünning, 1948, Borris, 1934, Wiechulla, 1932). Die sensible Periode des Mycels von *Pyronema confluens*, während der durch Belichtung in den Hyphen ein rosa Pigment entsteht, wurde schon von Bünning zu der Carotinanhäufung in den Trophocysten von *Pilobolus* in Beziehung gebracht. Bei *Pilobolus crystallinus* war, wie bei *Pyronema* die Belichtung der carotinreichen Trophocysten zur Weiterentwicklung nötig. Aber auch *Pilobolus sphaerosporus* durchlief diese sensible Periode, wie sich aus den Versuchen ergab, bei denen nach mehrtägiger Dunkelheit Licht viele „angesammelte" Trophocysten zum Auswachsen veranlaßte. Im Gegensatz zu *Pyronema*

wurden aber bei *Pilobolus sphaerosporus* nach längerer Zeit auch ohne Reiz Sporangienträger gebildet.

Das fortwährende Erscheinen neuer Wurzelblasen und auch die unperiodischen Sporangienabschüsse im Dauerlicht oder im Dauerdunkel lassen schließen, daß die sensible Periode bei *Pilobolus* mit zeitlich verschobener Phasenlage über das Mycel verteilt war. Im Stadium der Trophocysten schien eine Wachstumshemmung eingetreten zu sein, die durch Licht- oder Temperaturreize überwunden werden konnte. Alle vorhandenen Trophocysten wuchsen nach einem solchen Reiz gleichzeitig aus, gleichgültig, wie lange vorher sie schon gebildet waren. Die Phasen wurden durch den Reiz synchronisiert, die Sporangienträgerbildung erfolgte gemeinsam.

Außer dieser ersten, die gemeinsame Sporangienträgerentwicklung einleitenden Wirkung des Lichtes geben die Versuche Aufschluß über die zweite, die Entwicklung hemmende Wirkung, die sich in zweierlei Weise bemerkbar machte: Erstens verlängerten lange Lichtzeiten die Entwicklungszeit und zweitens verminderten sie die Zahl der Sporangien. Die Versuche bei 24 Std Zyklusdauer zeigten, daß die optimale Länge der Lichtzeit zwischen 1 und 4 Std lag. In den Zyklen 1:23 und 4:20 war die Entwicklungszeit am kürzesten (25—25½ Std) und die Zahl der täglich abgeschossenen Sporangien am größten. Mit zunehmender Belichtungszeit verlängerte sich die Entwicklungszeit bis zu 32 Std im Zyklus 21:3; die Sporangienabschußzahlen wurden geringer, bis sie im Zyklus 21:3 weniger als die Hälfte von denen im Zyklus 1:23 betrugen. Die Zahl der Sporangien im Zyklus 23:1 entsprach der im Dauerlicht. Periodizität trat bei 3 Dunkelstunden nur sehr schwach, bei einer Dunkelstunde gar nicht mehr auf.

Die rhythmischen Erscheinungen im Dauerdunkel, das den periodischen Beleuchtungswechseln folgte, waren 24stündig. Man kann daraus aber noch nicht ohne weiteres auf endogene Faktoren schließen, denn der Reiz lag ja ebenfalls in 24stündigen Perioden vor.

Der Übergang in die 24stündige Sporangienträgerbildung im Dauerdunkel nach Zyklen von kürzerer oder längerer Gesamtdauer als 24 Std ist dagegen als ein Beweis für das Vorhandensein einer endogenen Rhythmik anzusehen. Die Versuche in den Zyklen 4:4 bis 18:18 zeigten Entwicklungszeiten und Sporangienabschußzahlen, die dem Verhältnis 1:1 von Licht und Dunkelheit entsprachen. Die Bildung neuer Sporangienträgergenerationen wurde von jedem Lichtbeginn eingeleitet, die Weiterentwicklung verlief dem Zyklus 12:12 entsprechend, gleichgültig, ob das Licht in kleinen Portionen, wie beim Zyklus 4:4 über die ganze Zeit der Entwicklung bis zum Sporangienabschuß immer wieder, oder wie bei 18:18 nur einmal einwirkte. Hieraus könnte man entnehmen, daß sich eine Parallele zum Vorhandensein einer photophilen und

skotophilen Phase bei Blütenpflanzen (Bünning, 1949, Ehrenberg, 1950 und Bünsow, 1953) nicht ziehen läßt. Die Versuche mit während einer längeren Dunkelperiode eingeschaltetem „Störlicht" bestätigen dies zum Teil. Einstündiges Störlicht in einer 15stündigen Dunkelperiode wirkte in jedem Fall verlangsamend auf die Entwicklung, gleichgültig, in welcher Entwicklungsphase es die in Bildung begriffenen Sporangienträger traf. Für das Vorhandensein einer photophilen und skotophilen Phase könnten aber die beiden letzten Störlichtversuche sprechen, bei denen 3stündiges Störlicht am Anfang und in der Mitte der Dunkelperiode verschieden wirkte: Am Anfang verlangsamte es die Entwicklung der Sporangienträger und in der Mitte rief es eine neue Sporangienträgergeneration hervor.

Der periodische Wechsel von 2 Std Licht und 2 Std Dunkelheit, der zunächst wie Dauerlicht zu wirken schien, löste im Gegensatz zu Dauerlicht im anschließenden Dauerdunkel rhythmisches Sporangienschießen aus. Während des Beleuchtungswechsels waren allerdings weder eine 4stündige Rhythmik, noch die bei Blütenpflanzen bekannten Übergänge zur 24stündigen Rhythmik aufgetreten. Die rasch aufeinanderfolgenden Licht-Dunkelwechsel ließen rhythmische Vorgänge erst in der folgenden Dunkelheit zum Ausdruck kommen. Hier konnte also ein „Anstoßen" der endogenen Rhythmik im Sinne Bünnings erfolgt sein.

Weitere Versuche sollten Aufschluß geben über eine dritte Komponente der Lichtwirkung, nämlich die Beschleunigung des Sporangienabschießens durch Licht, das die reifen Sporangienträger im Endstadium der Entwicklung traf. Die Beobachtungen Coemans (1861) und Bünnings (1938) über beschleunigten Abschuß nach Einschalten von Licht konnten mit den hier angewandten Beleuchtungsintensitäten nicht bestätigt werden. Bünning weist allerdings schon darauf hin, daß der Sporangienabschuß durch Einschalten von Licht nicht in so starkem Maße gefördert wurde, wie er nach Coemans Beschreibungen erwartet hatte. Bei den obigen Versuchen zeigte die Lage der Maxima im Zyklus 1:47, daß der Sporangienabschuß der im reifen Stadium beleuchteten Sporangien nicht früher erfolgte als dann, wenn die reifen Sporangien kein Licht erhielten. Der Versuch im Zyklus 2:27 zeigte außerdem bei dem günstigen Beleuchtungswechsel von einer sehr langen Dunkelzeit mit einer optimalen Lichtzeit von 2 Std eine Entwicklungszeit von nur 24 Std, die der Rhythmik im Dauerdunkel entsprechen dürfte.

Die außerordentlich exakte Reaktion von *Pilobolus sphaerosporus* auf Lichteinwirkungen ließ vergleichende Versuche auch bei schwachen Lichtreizen zu. Wenn man die Entwicklungszeit als Maß für die Wirkung des Reizes benutzt, findet man ähnliche Verhältnisse wie beim Phototropismus oder bei anderen Lichtwachstumsreaktionen. Zahlreiche Autoren (z. B. Blaauw, 1915, Gessner, 1936, Oehlkers, 1926, Harder

u. Bode, 1943) haben die Gültigkeit des Reizmengengesetzes an den verschiedensten Objekten für kleine Bereiche festgestellt. Faßt man die eigenen, bei Beleuchtungsintensitäten von 0,1—1500 Lux mit Belichtungszeiten von $^1/_{200}$ sec bis 12 Std kombinierten Versuche zusammen, so findet man ebenfalls, daß die Entwicklungszeiten nur im Bereich kleinster Lichtmengen dem Produktengesetz i·t. folgten. Eine größere Anzahl von Luxsekunden ließ sich nicht mehr beliebig kombinieren, die Entwicklungszeit wuchs mit abnehmender Belichtungszeit und zunehmender Intensität.

Nach Bünning (1943 und 1948) können Temperaturreize ähnlich wie Lichtreize zu tagesperiodischen Bewegungen bei höheren Pflanzen führen. Von den beiden Temperaturversuchen Schmidles, in denen beim ersten ein 12:12stündiger Wechsel von 21° C und 25° C und beim zweiten eine einmalige Temperaturerhöhung von 21° C auf 25° C im Dauerdunkel periodisches Abschießen veranlaßte, zeigte nur der erste das gleiche Ergebnis mit den hier verwandten Stämmen. Die Wiederholung des zweiten Versuches ergab, wie auch die mit einmaligem Wechsel von Licht und Dunkelheit, kein rhythmisches Sporangienabschießen. Auch bei der Temperatur mußte ein periodisch wiederkehrender Reiz mindestens 3mal hintereinander vorgelegen haben; dann löste eine tägliche Temperaturerhöhung um 5° C rhythmische Abschußerscheinungen aus. Hier zeigte sich auch beschleunigter Sporangienabschuß als Wirkung des zweiten Reizes auf die schon reifen Sporangienträger. Ferner konnte ermittelt werden, daß die für die Entwicklungszeit optimale Temperatur bei 20—25° lag. Bei niedrigerer Temperatur wurde die Entwicklungszeit verlangsamt, wie aus der periodischen Sporangienträgerbildung, die dem periodischen Temperaturwechsel folgte, hervorging; die Maxima lagen dann 36 Std auseinander, die Entwicklungszeit war also auf 36 Std verlängert. Während der vorhergehenden täglichen Temperaturerhöhung betrug die Entwicklungszeit aber im Falle der Erwärmung von 15 auf 30° C nur 27 Std. Die Differenz von 9 Std mußte demnach in den 2 Std, während der die Kulturen auf 30° C erwärmt worden waren, aufgeholt worden sein. Das entspricht etwa einer Beschleunigung auf das 4½fache bei einer Temperatursteigerung um 15° C, und damit auch dem sonst gefundenen Temperaturkoeffizienten von 2—3 bei 10° Temperaturerhöhung. Bei optimaler Temperatur trat 24stündige Rhythmik auf, und die Entwicklung wurde nicht auf noch kürzere Zeit beschleunigt.

Ein 12stündiger Zyklus ließ sich, entsprechend dem Lichtzyklus 6:6 induzieren; er ging wie dort in die 24stündige Rhythmik über, wenn kein Reiz mehr vorlag.

Man könnte sich vorstellen, daß die endogene Rhythmik durch den Abschuß der Sporangien selbst, und zwar den gleichzeitigen Abschuß vieler Sporangien, der als Reiz für die nächste Generation wirkt (Stoffwechselprodukte?), gesteuert wird. Bei Zyklen von kürzerer als 24stündiger

Gesamtdauer könnte der letzte gemeinsame Sporangienabschuß, der durch Licht- oder Temperaturwirkung zustandekam, die Rhythmik auslösen. Aber auch eine solche Überlegung würde nicht erklären, warum nach dem Zyklus 2:2 im anschließenden Dauerdunkel der 24 Std-Rhythmus auftritt.

Zusammenfassung.

1. Dauerlicht und Dauerdunkel ohne vorhergegangene periodische Beleuchtung verhinderten periodische Sporangienträgerbildung.

2. Nach 3tägiger periodischer Beleuchtung in den Zyklen 23:1, 21:3, 15:9, 12:12, 9:15, 6:18, 4:20 und 1:23 traten rhythmische Erscheinungen auch im Dauerdunkel auf, nicht aber im Dauerlicht. Die Periodizität des Sporangienabschusses war im Dauerdunkel angenähert 24stündig. Nach nur 1- oder 2tägiger periodischer Beleuchtung traten auch im Dauerdunkel keine rhythmischen Erscheinungen auf.

3. In den Licht-Dunkelwechseln 4:4, 6:6, 8:8, 10:10, 16:16 und 18:18 regte jeder Lichtbeginn die Bildung einer neuen Sporangienträgergeneration an. Die Periodizität folgte dem induzierten Rhythmus. Sie ging aber im nachfolgenden Dauerdunkel in den 24-Std-Rhythmus über.

4. Im Zyklus 2:2 wurde die periodische Sporangienträgerbildung unterdrückt, erst im anschließenden Dauerdunkel trat rhythmisches Sporangienschießen in 24stündiger Periodizität ein.

5. Auch sehr kurze Lichtreize, bis hinab zu $^1/_{200}$ sec (bei 100 Lux) und sehr geringe Lichtintensitäten bis hinab zu 0,3 Lux (bei 1 sec) vermochten periodischen Sporangienabschuß zu induzieren. Das Reizmengengesetz galt dabei nur für einen sehr kleinen Bereich.

6. Lange Lichteinwirkungen verlängerten die Entwicklungszeit und verminderten die Zahl der gebildeten Sporangien.

7. Einmaliger Wechsel von langer Lichtzeit und dauernder Dunkelzeit regte keine rhythmischen Sporangienbildungen an.

8. 1 Std Störlicht, das im Zyklus 9:15 in die 15stündige Dunkelzeit eingeschaltet wurde, verlängerte die Entwicklungszeit der Sporangienträger, und zwar je nach dem Zeitpunkt der Einschaltung in verschieden starken Grade.

9. Temperaturerhöhung um 5° C löste bei täglich 1 Std Einwirkung periodische Sporangienträgerbildung aus. Nach 3 Tagen mit Temperaturwechseln erfolgte im Dauerdunkel bei konstanter Temperatur noch 3 bis 4 Tage lang periodisches Sporangienabschleudern im 24-Std-Rhythmus.

10. Bei periodischer Temperaturerniedrigung um 5 oder 10° C löste nicht die Abkühlung, sondern die der 1stündigen Abkühlung folgende Wiedererwärmung periodische Sporangienträgerbildung aus.

11. Die inneren Faktoren kamen nur zur Wirkung, wenn sie durch periodische Außenreize angestoßen wurden; sie konnten durch Außeneinflüsse sehr stark überlagert sein.

Herrn Professor Harder bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit und die stete Unterstützung bei ihrer Ausführung zu großem Dank verbunden.

Literatur.

Bersa, E.: Kultur und Ernährungsphysiologie der Gattung Pilobolus. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturwiss. Kl. Abt. 1 **139** (1929). — Blaauw, A. H.: Licht und Wachstum. Z. Bot. **7** (1915). — Borris, H.: Über den Einfluß äußerer Faktoren auf Wachstum und Entwicklung der Fruchtkörper von Coprinus lagopus. Planta (Berl.) **22** (1934). — Brettschneider, J.: Anwendung der Varianzanalyse in der experimentellen Medizin. Diss. der medizinischen Fakultät Göttingen 1952. — Buller, A. H. R.: A systematic acount of the Pilobolidae. Researches on Fungi, New York 1934. — Bünning, E.: Untersuchungen über die autonomen tagesperiodischen Bewegungen der Primärblätter von Phaseolus multiflorus. Jb. Bot. **75** (1932); Phototropismus und Carotinoide. Planta (Berl.) **27** (1938); Die Anpassung der Pflanze an den jahres- und tagesperiodischen Wechsel der Außenbedingungen. Naturwiss. **31** (1934); Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Berlin 1948; Untersuchungen über den physiologischen Mechanismus der endogenen Tagesrhythmik bei Pflanzen. Z. Bot. **37** (1949). — Bünsow, R.: Endogene Tagesrhythmik und Photoperiodismus bei Kalanchoë Bloßfeldiana. Planta (Berl.) **42** (1953). — Coemans, E.: Monographie du genre Pilobolus. Mém. cour. et des sev. étrang. Acad. roy. de Belge **30** (1861). — Ehrenberg, M.: Beziehungen zwischen Fermenttätigkeit und Blattbewegung bei Phaseolus multiflorus unter verschiedenen photoperiodischen Bedingungen. Planta (Berl.) **38** (1950). — Fisher, R. A.: Statistical Methods for Research Workers. London 1944. — Fisher, R. A., and F. Yates: Statistical Tables. London 1949. — Flügel, A.: Die Gesetzmäßigkeit der endogenen Tagesrhythmik. Planta (Berl.) **37** (1949). — Gessner, F.: Phototropismus und Wanddehnbarkeit. Jb. wiss. Bot. **82** (1936). — Gräntz, F.: Über den Einfluß des Lichtes auf die Entwicklung einiger Pilze. Diss. Leipzig 1898. — Harder, R., u. O. Bode: Wirkung von Zwischenbelichtung bei der Kurztagpflanze Kalanchoë Bloßfeldiana. Planta (Berl.) **33** (1943). — Klein, D.: Influence of varying light and dark on asexual reproduction of Pilobolus Kleinii. Bot. Gazette **110** (1948). — Kleinhoonte, A.: Untersuchungen über die autonomen Bewegungen der Primärblätter von Canavalia ensiformis. Jb. Bot. **75** (1932). — Oehlkers, K.: Phototropische Untersuchungen an Phycomyces nitens. Z. Bot. **19** (1926). — Palla, E.: Zur Kenntnis der Pilobolusarten. Österr. Bot. Z. **50** (1900). — Pfeffer, W.: Beiträge zur Kenntnis der Entstehung der Schlafbewegungen. Abh. sächs. Akad. wiss. Math.-phys. Kl. 34 (1915). — Pringsheim, E. G., u. V. Czurda: Phototropische und ballistische Probleme bei Pilobolus. Jb. Bot. **66** (1927). — Schmidle, A.: Die Tagesperiodizität der asexuellen Reproduktion von Pilobolus sphaerosporus. Arch. f. Mikrobiologie **16** (1951). — Schmitz, H.: Über die Beziehungen zwischen Blütenbildung in verschiedenen Licht- und Dunkelkombinationen und Atmungsrhythmik. Planta (Berl.) **39** (1951). — Snedecor, G. W.: The Iowa State College Press Statistical Methods. 1950. — Stiefel, S.: Über die Erregungsvorgänge bei der Einwirkung von photischen und mechanischen Reizen auf Coprinus-Fruchtkörper. Planta (Berl.) **40** (1952). — Stoppel, R.: Die Abhängigkeit der Schlafbewegungen von Phaseolus multiflorus von verschiedenen Außenfaktoren. Z. Bot. **8** (1916). — Vickar, Mc., D. L.: The lightcontrolled diurnal rhythm of asexual reproduction in Pilobolus. Amer. J. of Bot. **29** (1942). — Vorderberg, K.: Die Abhängigkeit der Fruchtkörperentwicklung bei Coprinus lagopus von inneren und äußeren Faktoren. Planta (Berl.) **37** (1949). — Wiechulla, O.: Beiträge zur Kenntnis der Lichtwachstumsreaktion von Phycomyces. Beitr. Biol. Pflanz. **19** (1932).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 34—62 (1954).

(From the Hopkins Marine Station of Stanford University, Pacific Grove, Calif.)

Studies on Thiobacillus denitrificans.

By

K. Baalsrud and Kjellrun S. Baalsrud[1].

With 8 figures in the text.

(Eingegangen am 9. November 1953.)

I. The cultivation of Thiobacillus denitrificans.

During the course of an investigation of the carbon dioxide assimilation by representatives of the genus *Thiobacillus* it became desirable to compare the behavior of *T. thioparus* and *T. thiooxidans* with that of *T. denitrificans*. This made it necessary to isolate pure cultures of the last-named organism. It soon became apparent that the procedures used by Beijerinck, Lieske, and Gehring, the only investigators who had previously reported on the successful isolation of pure cultures, could be considerably improved by the introduction of some small but significant modifications. In view of the fact that *T. denitrificans* has not been generally available, and that Sijderius, as late as 1946, reported to have failed completely in his attempts at isolating this bacterium in pure culture, we here present a description of the method which, in our hands, has given eminently satisfactory results, along with the reasons for adopting the specific changes.

Experiments on some physiological and biochemical properties of the isolated strains have broadened our knowledge of this remarkable bacterium; the results obtained are treated in subsequent sections. They may serve to show that *T. denitrificans*, now for the first time made easily accessible, possesses a number of characteristics which render it especially suitable for the study of certain unusual phenomena.

1. Brief review of previous studies.

Approximately a decade after Winogradsky had firmly established his revolutionary concept of chemosynthesis, initiated by his classical studies on the sulfur bacteria, and developed to its ultimate consequences through his investigations on the nitrification process (see Winogradsky, 1949). Beijerinck (1904) provided the first evidence for the existence of chemosynthetic bacteria that can develop in the absence of oxygen. He observed that in glass-stoppered bottles, completely filled with an aqueous solution of $MgCl_2$, K_2HPO_4, KNO_3, and Na_2CO_3, containing a sediment of elementary sulfur and $CaCO_3$, and inoculated with canal water or mud, a bacterial flora developed which caused an oxidation of the sulfur to sulfate,

[1] Present address: Biological Laboratory, University of Oslo, Oslo, Norway.

accompanied by a reduction of the nitrate to nitrogen. Since carbonates constituted the only available carbon source, it was concluded that the cell substance was formed from CO_2 by chemosynthesis.

Beijerinck named the bacterium responsible for the oxidation of sulfur by denitrification *Thiobacillus denitrificans*, thus distinguishing it from his *T. thioparus*, another small, sulfur oxidizing organism which is morphologically very similar, but lacks the denitrifying capacity (Nathansohn, 1902; Beijerinck, 1904). Although apparently no serious difficulties were experienced in isolating *T. denitrificans* in pure culture, the observation was made that pure cultures never developed as vigorously in the inorganic medium as did the crude cultures. The loss of vigor was later (Beijerinck, 1920) attributed to a gradual transformation of the strictly autotrophic form of the bacteria into a „physiological variant" with heterotrophic properties, a phenomenon which Beijerinck had earlier (1914) claimed for *Nitrobacter*. This contention was challenged by Winogradsky in 1922 (see Winogradsky, 1949), and has never received convincing experimental support; especially the careful researches of Kingma Boltjes (1935) have done much to dispel the notion of such transformations in pure cultures of nitrifying bacteria.

Surprisingly little attention has been paid to *T. denitrificans*. Only Lieske (1912a, b) appears to have published an additional and detailed account of the organism, based on elective and pure culture studies. He introduced the innovation of substituting thiosulfate for sulfur as the oxidizable substrate, and noticed that in the crude cultures, prepared in tall glass cylinders filled with clear medium, bacterial accumulations occurred at several levels, in the form of distinct and narrow bands. From this behavior Lieske concluded that the name, *T. denitrificans*, if applied to all thiobacilli with denitrifying power, would probably comprise a variety of physiological races, characterized by their differential development under different oxygen tensions. By deliberately restricting the isolation of a pure culture to the type that produced an accumulation nearest the bottom of the container, Lieske procured a strain with somewhat anaerobic tendencies; it did not grow in media of satisfactory composition when the oxygen tension exceeded one-fifth that of the atmosphere. This fact is probably responsible for the allegations in the literature that *T. denitrificans* is a strict anaerobe. Lieske's culture behaved like an obligatory autotroph; it could not be grown in the absence of an oxidizable sulfur compound, at the expence of organic substances. No special mention was made of a gradual loss in vitality of the culture, except for the statement that this does occur during prolonged cultivation of the organism on agar media; an explanation of this phenomenon was not attempted.

A few years later Gehring (1915) demonstrated the common occurrence of *T. denitrificans* in soils and other natural environments; he also reported the isolation of pure cultures, whose activity appeared much reduced compared to that of the crude cultures.

While the above-mentioned investigators showed that elective cultures can be easily established, they also indicated that the isolation of pure cultures is far more difficult. The invariable presence in the crude cultures of denitrifying bacteria unable to develop in strictly mineral media was emphasized particularly by Lieske, and has recently been corroborated by Sijderius (1946). In fact, Lieske's first isolates were not chemoautotrophs at all, and Sijderius could isolate none but heterotrophic denitrifiers from his crude cultures. This experience led Sijderius to the conclusion that the contaminants, mostly representa-

tives of *Pseudomonas stutzeri*, rapidly overgrow *T. denitrificans*. It must be admitted that the small amount of organic matter needed for a relatively copious development of *P. stutzeri* might readily account for the number of this organism encountered in the first crude cultures. Nevertheless, it seems difficult to believe that the rapid denitrification and concomitant oxidation of sulfur or thiosulfate to sulfate must actually be attributed to the activities of a minority organism in an essentially inorganic medium, especially because in a favorable environment the rate of growth of *T. denitrificans* is far from low, and contamination with organic substances is quite limited. It seems far more reasonable to explain Sijderius' results in a different manner; this will be attempted below.

2. Experiments with crude cultures.

Elective cultures for *T. denitrificans* were prepared by incubating glass-stoppered bottles, completely filled with a medium composed of tapwater, 0.05% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 1% $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 0.2% KNO_3, and 0.2% $NaHCO_3$, and severally inoculated with garden soil and two different samples of freshwater mud, at 30°. One further culture in a solution which contained, in addition to the above-mentioned ingredients, 3% NaCl was inoculated with marine mud.

After two weeks the contents of the bottles had become slightly turbid; a slow gas production, originating in the sediment, was evident; and titration with iodine showed that in all the bottles some thiosulfate had been decomposed. The small amount of liquid removed for the titrations was replaced with water, the completely filled bottles re-incubated, and periodically tested for residual thiosulfate. When no further decrease in thiosulfate concentration was noticeable, about $^2/_3$ of the liquid was poured off, and the bottles refilled with fresh medium. After a few days' incubation gas evolution was resumed, accompanied by the disappearance of thiosulfate. The above-mentioned treatment was repeated until the cultures produced gas immediately after the addition of fresh medium. At this stage the liquid was no more than slightly turbid, and the gas bubbles still arose mainly from the sediment.

Transfers were prepared by inoculating fresh medium in bottles with small amounts of the turbid liquid from the first cultures. At best these transfers developed very poorly. Subcultures in Lieske's medium[1] gave no better results.

This outcome suggested that the organisms growing in the first cultures, which invariably showed greater activity than did the transfers, were developing at the expence of ingredients not supplied by the culture medium, but introduced with the mud or soil samples. Because denitri-

[1] H_2O, 0.01% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.02% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.5% $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 0.5% KNO_3, 0.1% $NaHCO_3$, and traces of $CaCl_2$ and $FeCl_3$.

fication often leads to a virtually quantitative conversion of nitrate to N_2, it was considered possible that the extremely slow growth was due to the absence in the culture medium of reduced nitrogen compounds that might be required for protein synthesis. Such a situation has actually been described by RUSAKOWA and BUTKEVICH (1941) who found that *Achromobacterium arcticum*, a marine organism which produces N_2 from nitrate and nitrite, cannot develop unless the medium contains an ammonium salt or amino acid. This consideration led us to add 0.1% NH_4Cl to the medium, and indeed this permitted the establishment of actively denitrifying subcultures. A further improvement of the culture solution resulted from supplementation with 0.001% $FeCl_3$, or, even better, $FeSO_4$.

Thus the greater activity of our first crude cultures may be ascribed to a slow production of NH_3 by contaminants growing at the expence of organic matter present in the mud or soil used as inoculum. This would account for the failure of subcultures to grow, since the fresh medium was essentially devoid of organic substances. On this basis SIJDERIUS' experience also becomes understandable, because the development of *T. denitrificans* in his culture media, too, would depend on the activities of other bacteria.

With the improved medium experiments were conducted to determine the p_H optimum for growth and gas production, and the appropriate concentration of phosphate buffer. The former was found to be in the range 6.0—7.2; the upper limit of the phosphate concentration appeared to be about 1%.

3. Isolation and maintenance of pure cultures.

The availability of a medium in which cultures of the denitrifying thiobacilli could be readily propagated in serial transfers also rendered the isolation of pure cultures an easy matter.

For this purpose a solid medium was used, composed of tapwater with 2% agar, 0.05% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1% NH_4Cl, 0.5% $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, and 0.5% KNO_3. Just before solidification solutions of phosphate, $FeCl_3$, and $NaHCO_3$, separately sterilized, and the last one satured with CO_2, were added aseptically to yield final concentrations of 0.1% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.1% KH_2PO_4, 0.1% $NaHCO_3$, and 0.0005% $FeCl_3$; the p_H of the complete medium was approximately 7.0.

Shake cultures as well as streak plates were prepared; the latter were incubated in vacuum desiccators filled with CO_2, and evacuated to a final pressure of about 50 mm Hg. The plate cultures proved the more satisfactory because the colonies were more easily accessible, and the entire plates could be examined under a microscope for details of colonial morphology. A characteristic feature of the organism is the precipitation of sulfur in the colonies. This was used to select the proper type of colony for replating. Suspensions from well-isolated colonies of homogeneous appearance were streaked on second plates, and this process was repeated whenever necessary until careful inspection at moderate magnification failed to reveal the presence of more than one colony type. At this point the cultures were considered pure.

Our experience with the agar plate cultures obtained from the bottles with fresh water media indicated that in each case only one colony type

was produced that gave consistently good growth on successive transfers. Furthermore, the three cultures isolated from the different sources were, as far as could be ascertained, identical; the macroscopic and microscopic appearance of the colonies, the morphological properties of the bacteria, and their physiological behavior exhibited no detectable differences. Since the fresh water cultures developed somewhat faster than the saltwater cultures, the latter were not pursued any further.

Microscopic examination showed the bacteria to be highly motile, gram-negative, short rods, approximately 0.5 by 1.0 μ. Spore formation has never been observed. These characteristics, together with the ability of the pure cultures to grow anaerobically in a strictly mineral medium containing thiosulfate and nitrate, in which they produce sulfate and N_2, justify the conclusion that the pure cultures represent *T. denitrificans* Beijerinck, using this binominal in the rather broad sense of Lieske.

In view of the results of experiments on the physiological properties of the freshwater strains the medium for their maintenance was later somewhat modified.

The following composition has proved eminently satisfactory: Tapwater, 0.05% NH_4Cl, 0.05% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2% KH_2PO_4, 0.5% $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 0.2% KNO_3, 0.1% $NaHCO_3$, 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. For solid media 2% agar is added; the phosphate-, bicarbonate-, and $FeSO_4$-solutions are separately sterilized, the last one in 0.1 n HCl; the p_H of the final medium is adjusted to approximately 7.0. Liquid cultures are conveniently prepared in glass stoppered bottles; agar cultures have been maintained as stabs. We have found that stab cultures in the above-described medium may remain viable for as long as two months.

It will be evident that the above medium is also suitable for the preparation of the elective cultures.

II. Physiological characteristics of the isolated strains.

1. Effect of oxygen.

Compared to the culture isolated and studied in detail by Lieske, our strains are less sensitive to oxygen; all three develop normally when exposed to air at atmospheric pressure. Growth under these conditions does not require the presence of nitrate in the medium; only in anaerobic cultures is the development dependent on a supply of nitrate. On aerobically incubated agar plates the rate of growth of *T. denitrificans* is about the same as that of the non-denitrifying *T. thioparus* and *T. thiooxidans*, as judged by the relative size of the colonies of the different organisms after incubation on suitable media for the same length of time.

Present knowledge of the denitrifying bacteria indicates that they grow, without exception, at the expence of oxidative processes for which either O_2 or nitrate can be used as the ultimate hydrogen (or electron) acceptor. The behavior of *T. denitrificans* conforms to this pattern; a strictly anaerobic representative of this type has never yet been reported.

Transfer of *T. denitrificans* from a 4-day old, aerobically incubated agar plate to an anaerobic liquid medium develop and produce gas at approximately the same rate as do transfers from anaerobic cultures. But after several consecutive aerobically grown subcultures, the ability to grow anaerobically in nitrate solutions is lost. Such a loss of denitrifying capacity by repeated transfer under aerobic conditions has also been observed for other denitrifying bacteria, and LIESKE's statement that *T. denitrificans* loses its 'vitality' by growth on agar must probably be attributed to the same cause. Whether the phenomenon is the result of a selection of non-denitrifying mutants during continued cultivation in air, or of a gradual loss of the nitrate reducing enzyme system, has not been determined.

2. Influence of organic substances.

The few studies devoted to *T. denitrificans* suggest that this bacterium, like *T. thioparus* and *T. thiooxidans*, is an obligatory chemo-autotroph. However, a denitrifying *Thiobacillus*, capable of growing aerobically at the expence of organic substrates, has been reported by TIULPANOVA-MOSEVICH (1930). In view of the existence of facultatively autotrophic, non-denitrifying thiobacilli, such as *T. novellus*, described by STARKEY (1934; 1935a, b), there is no reason to doubt the existence of facultatively autotrophic denitrifying representatives. Consequently, we have examined the behavior of our three freshwater strains in this respect.

For this purpose a medium was used composed of tapwater with 0.2% NH_4NO_3, 0.05% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.05% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO_4$, 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, and 2% agar. It was supplemented with any one of the following substances: $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ (0.5%); ethanol, Na-acetate, Na-butyrate, Na-lactate, Na-succinate, glycerol, mannitol, glucose, fructose, alanine, or NaH-glutamate, each in a final concentration of 0.2%, and yeast autolysate (2%). The several media were used for preparing streak plates as well as shake cultures, which were incubated for 10 days at 30°, the former aerobically, the latter under a paraffin seal.

Only the cultures with thiosulfate showed growth, both aerobically and anaerobically; no development could be observed in any of the cultures with organic substrates. The three strains therefore behaved like obligatory chemo-autotrophs.

So far we have not determined whether the presence of organic substances has any effect on the development of cultures in the presence of thiosulfate.

3. Ammonia requirement.

The response of the crude cultures has indicated that nitrate cannot serve as the sole nitrogen source for *T. denitrificans*. Since the simultaneous presence of an ammonium salt so markedly improved growth, experiments were conducted with one of our pure cultures (No. 18) to determine the effect of different concentrations of NH_4Cl.

Cultures were prepared in completely filled glass-stoppered bottles, in a nitrate-thiosulfate medium containing 1.7 μg. Fe per ml., supplemented with NH_4Cl in concentrations ranging from 0.83 to 83 mg. per 100 ml.

Growth was poor in media with less than 0.0083% NH_4Cl, but normal growth was observed in the cultures with 0.0083—0.083% NH_4Cl; the rate and extent of development appeared not to be affected in this range.

These results indicate that the absence of ammonium salts in the media of Beijerinck, Gehring, and Sijderius may have been the chief reason for the difficulties experienced by these workers in the isolation of *T. denitrificans*, as well as for the decrease in activity of pure cultures. Lieske's studies, on the other hand, suggest the existence of strains that can use nitrate as the only nitrogen source. Had such organisms been present in the inocula used for our crude cultures, they should have developed therein, and thus permitted the establishment of satisfactory subcultures in ammonia-free media. That this was not possible implies either that such types are extremely rare, or that Lieske's mineral solution did contain a small amount of ammonium salts, added as impurity with the various ingredients. The latter situation appears to us the more probable.

4. Iron requirement.

As mentioned earlier, a notable improvement of the culture medium resulted from the addition of small amounts of iron salts. The absolute need for this element was demonstrated in experiments with strain No. *18* on the effect of different Fe-concentrations on its growth.

Again, cultures were prepared in bottles, completely filled with an iron-free liquid medium to which graded quantities of a separately sterilized solution of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ in 0.1 n HCl were added at the time of inoculation. Ferrous sulfate rather than $FeCl_3$ was used in these experiments because it had meanwhile been found that an autoclaved dilute solution of the latter no longer produced the characteristic color reaction with *o*-phenanthrolin, owing to the formation of colloidal $Fe(OH)_3$. It was established that the $FeSO_4$ solution was not altered by sterilization.

Growth was estimated by visual inspection for the degree of turbidity. Little or no development occurred in media with concentrations up to 0.083 μg. Fe per ml.; excellent cultures were obtained when the concentration was 0.25—8.3 μg. Fe per ml. Over this range the rate of growth as also the final density of the cultures appeared to be independent of the amount of Fe present.

The necessity of iron for the development of *T. denitrificans* is readily understandable in view of the association of cytochromes with the process of nitrate reduction in general (Sato a. Egami, 1949; Allen a. van Niel, 1952; Sato a. Niwa, 1952). Also in cell suspensions of *T.*

denitrificans cytochromes can be easily detected; under reducing conditions and in the absence of nitrate such suspensions show pronounced absorption bands at 522 and 548 mμ.

5. Influence of p_H *and buffer concentration.*

The oxidation of thiosulfate by *T. denitrificans* yields two mols of sulfate per mol of thiosulfate oxidized:

$$Na_2S_2O_3 + H_2O + 4O \rightarrow 2NaHSO_4.$$

As a consequence the cultures tend to become acid. This is particularly noticeable if they are grown under aerobic conditions; during anaerobic cultivation, where thiosulfate oxidation is coupled with the reduction of nitrate:

$$2KNO_3 + H_2O \rightarrow N_2 + 2KOH + 5O,$$

the liberation of alkali in the latter process almost completely balances the acid formation.

In preliminary experiments it was found that *T. denitrificans* develops best in approximately neutral media. If the p_H of a culture drops below 6, the bacteria are rapidly inactivated. For the maintenance of cultures it is, therefore, important to prevent an appreciable rise in acidity. This can easily be accomplished by the use of appropriate phosphate buffers.

Detailed information on the effect of p_H and of the concentration of phosphate on the activity of *T. denitrificans* was obtained in the course of manometric experiments. These will be discussed in connection with the biochemical properties of the organism. In general, the results have shown that resting cell suspensions display optimal activity over the p_H range 6.2—7.0, and in the presence of 0.05 m phosphate. It seems reasonable to infer from these data that the same conditions represent the optimum also for growing cultures.

III. Biochemical characteristics of Thiobacillus denitrificans.

1. The oxidation of thiosulfate.

In liquid media of appropriate composition *T. denitrificans* develops rapidly under anaerobic conditions. The medium becomes turbid and gas is liberated. The turbidity is not exclusively the result of an increase in the number of bacteria; microscopic examination reveals that a considerable quantity of elementary sulfur, present in the form of small globules, contributes materially to the opacity of the cultures.

Towards the end of the period of gas production the turbidity visibly decreases; coincidentally, the amount of sulfur diminishes, and the sulfate concentration rises. These observations show that *T. denitrificans* can also oxidize elementary sulfur. Since Beijerinck obtained elective

cultures of the organism in media with sulfur instead of thiosulfate as the oxidizable material, this was to be expected. Furthermore, Lieske had found that his pure culture developed satisfactorily when supplied with sulfur instead of thiosulfate.

By means of manometric experiments we have demonstrated that cell suspensions of *T. denitrificans* can oxidize both thiosulfate and sulfur with either oxygen or nitrate as the oxidizing agent. In both cases the rate of sulfur oxidation is lower than that of thiosulfate; since free sulfur accumulates in the cultures, this, too, was anticipated.

The manometric experiments have also provided evidence for the contention that tetrathionate is the first product of thiosulfate oxidation by *T. denitrificans*. If cell suspensions are stored for an undue length of time, or if the cells are harvested from cultures in which, due to the accumulation of nitrite, their oxidative ability is impaired (see below), they often oxidize thiosulfate only to tetrathionate. This is entirely in line with the observations which Vishniac (1949, 1952) has made in the course of his studies on non-denitrifying thiobacilli. Our records show that cell suspensions of *T. denitrificans* unable to oxidize thiosulfate beyond the stage of tetrathionate carry out this incomplete oxidation only in the presence of O_2; they generally do not display any denitrifying activity.

Cell suspensions in a physiologically healthy state, on the other hand, oxidize tetrathionate as well as thiosulfate and sulfur, and do so with either O_2 or nitrate as the oxidant. The rates of O_2 consumption and N_2 evolution are appreciably lower with sulfur than with thiosulfate or tetrathionate as the oxidizable substrate.

Formation of elementary sulfur by cultures of thiobacilli in thiosulfate media is probably the result of a purely chemical reaction between residual thiosulfate and polythionates accumulating as intermediate oxidation products. This interpretation was first advanced by Nathansohn (1902), and has received experimental support from Vishniac's investigations (1949, 1952) with *T. thioparus*. So far, we have not extended our observations with *T. denitrificans* to bear on this point.

For studies on the oxidation of specific substances by resting cell suspensions of *T. denitrificans* the accumulation of sulfur in the cultures is a great inconvenience, because this makes it practically impossible to prepare physiologically active suspensions that are initially free of oxidizable substrate. Sulfur-containing suspensions consume O_2, produce N_2 from nitrate, and assimilate CO_2 even if no additional substrate is supplied, and the oxidation of sulfur can proceed simultaneously with that of other sulfur compounds. Interpretation of the oxidative aspects of the metabolic activities of a suspension following the addition of a known amount of substrate consequently requires precise data on the extent to which sulfur oxidation has participated and on the nature and

quantity of the various complete and incomplete oxidation products formed from the added substrate and from the sulfur. These can be obtained only by elaborate and difficult chemical analysis, at present not applicable to the small quantities encountered in manometric experiments. Although the reductive phase of the metabolic activities involves changes in the amounts of gaseous substances (O_2, N_2, CO_2) which can be measured with great precision by manometric methods, the establishment of exact quantitative relations between substrate oxidation on the one hand, and reduction of O_2, nitrate, and CO_2 on the other, is thus precluded.

Preparation of sulfur-free suspensions by differential centrifugation has not proved feasible; while part of the sulfur sediments relatively rapidly, it carries with it a large proportion of the cells, and even the deposits obtained by centrifugation of suspensions from which most of the sulfur has previously been spun down are never sufficiently free of sulfur to eliminate the above-mentioned complications in manometric experiments.

It may appear that sulfur-free cultures could be obtained by growing the bacteria in a medium with an excess of nitrate over thiosulfate, so that in due course the substrate oxidation would go to completion. However, for reasons that will be discussed below, this treatment also does not produce the desired result.

If the sulfur formation is indeed caused by a purely chemical reaction between residual thiosulfate and intermediate oxidation products, sulfur-free cultures should be obtainable by substituting tetrathionate for thiosulfate as the oxidizable substrate in the culture medium. This possibility we have not yet investigated. In planning such experiments it must be kept in mind that an initially neutral medium with tetrathionate becomes acid much more rapidly than one with thiosulfate, so that special precautions will be required to prevent too great a drop in p_H.

Oxidation of residual sulfur can, of course, be accomplished by exposing the suspensions to O_2, a procedure which we have effectively used to obtain sulfur-free suspensions of *T. thioparus* (Baalsrud a. Baalsrud, 1952). But because such treatment causes an inactivation of the denitrifying enzyme system, a phenomenon that has also been observed with other denitrifying bacteria, it has only limited application to studies with *T. denitrificans*.

A virtually sulfur-free suspension of this organism, still capable of inducing a rapid denitrification, has been secured by shaking a sulfur-containing suspension in an atmosphere of N_2O, which the bacteria can use as an oxidant. Excessive acidification during this treatment was prevented by intermittent neutralization. The final suspension showed an insignificant O_2 uptake prior to the addition of thiosulfate, and N_2

production depended upon the addition of both thiosulfate and nitrate. The results of the experiment are presented in Fig. 1.

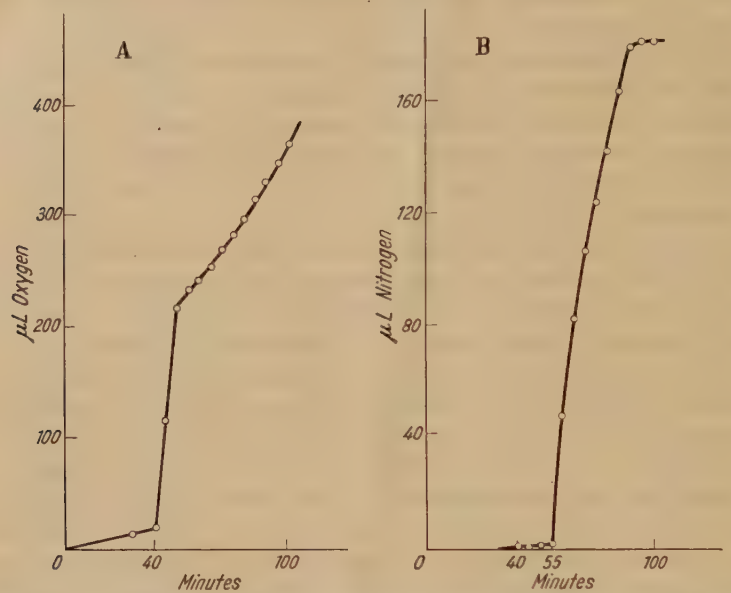


Fig. 1. Oxidation of thiosulfate by sulfur-free cell suspensions of *T. denitrificans*. *A* Aerobic conditions; 25 µm. thiosulfate added after 40 minutes. *B* Anaerobic conditions; 16 µm. nitrate added after 40 minutes, and 25 µm. thiosulfate after 55 minutes.

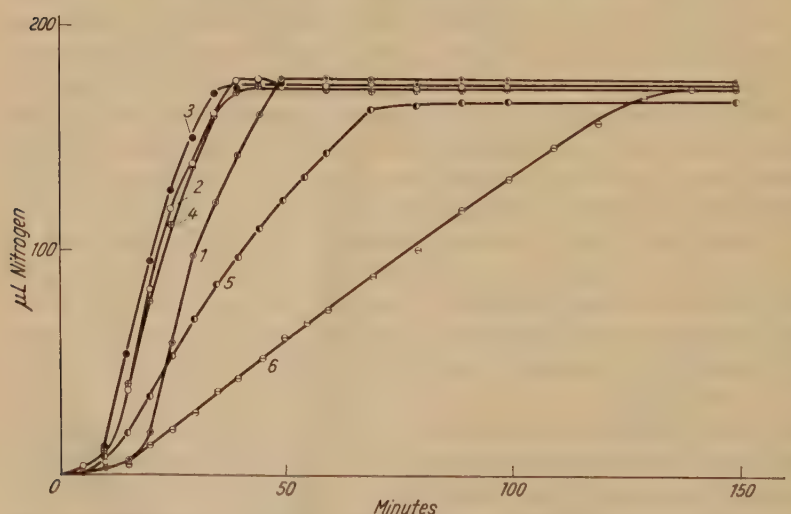


Fig. 2. Denitrification by suspensions of *T. denitrificans* at different p_H; 25 µm. thiosulfate and 16 µm. nitrate added at zero time. Curve *1*; Initial p_H 5.86, final p_H 5.96; Curve *2*: Initial p_H 6.23, final p_H 6.10; Curve *3*: Initial p_H 6.47, final p_H 6.26; Curve *4*: Initial p_H 6.83, final p_H 6.60; Curve *5*: Initial p_H 7.57, final p_H 7.18; Curve *6*: Initial p_H 8.02, final p_H 7.39.

We shall not attempt to interpret the rather sudden change in rate of O_2 consumption after only 200 μl. had been used; it is probable that this coincided with the disappearance of thiosulfate, and the accumulation of incomplete oxidation products. The amount of N_2 produced (181 μl.) in the anaerobic experiment corresponded to that expected from a quantitative reduction of the added nitrate to N_2 (179 μl.).

The results of manometric experiments with sulfur-containing cell-suspensions on the influence of p_H and of the concentration of phos-

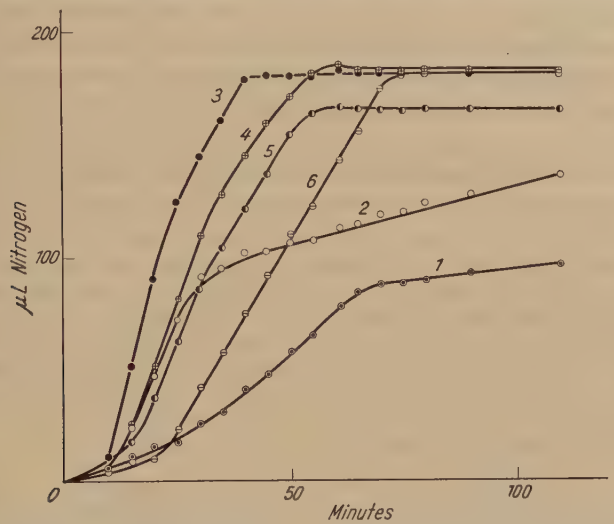


Fig. 3. Denitrification by suspensions of *T. denitrificans* at p_H 6.4, in phosphate buffer of different concentrations; 25 μm. thiosulfate and 16 μm. nitrate added at zero time. Phosphate concentrations: Curve *1*: 0.15 m; curve *2*: 0.1 m; curve *3*: 0.05 m; curve *4*: 0.025 m; curve *5*: 0.0125 m; curve *6*: 0.005 m.

phate buffer on the denitrification process in the presence of excess thiosulfate are illustrated by Figs. 2 and 3.

They provide the basis for the practice, adhered to in most of our manometric experiments, of preparing cell suspensions in 0.05 m phosphate buffer at p_H 6.4.

2. *Accumulation and toxicity of nitrite in anaerobic cultures of T. denitrificans.*

Anaerobic cultures in media with 0.5% each of $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ and KNO_3 cease to produce gas at a time when they still contain abundant oxidizable substrate in the form of sulfur. Cell suspensions prepared from cultures in this stage display very low activity in manometric experiments. Although it might be suspected that the cessation of gas production is due to the lack of sufficient oxidant in the medium, a simple calculation shows that the complete oxidation of 0.5 g. $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$

would require only 0.326 g. KNO_3 if this substance were reduced to N_2, as it unquestionably is, at least in large part, during the period of rapid gas evolution. Hence this kind of explanation would be tenable only if a more oxidized product of nitrate reduction were to accumulate in considerable amounts, and if such a substance could not be used by the bacteria for the subsequent oxidation of sulfur.

Furthermore, the low activity of the bacteria suggests damage to their enzyme systems by the accumulation of toxic substances in the culture medium. The normal end products of thiosulfate oxidation and of nitrate reduction, sulfur, sulfate, and N_2, can hardly be envisaged as inhibitory. Hence it seemed more likely that incomplete oxidation or reduction products were responsible for the inactivation.

Lieske's experiments with *T. denitrificans* have shown that products of incomplete oxidation do accumulate to some extent during the oxidation of elementary sulfur. This is substantiated by the following quotation:

„Die Nährlösung einer Kultur mit elementarem Schwefel als Energiequelle wurde untersucht, und zwar einen halben Tag, nachdem eine deutliche Gasentwicklung begonnen hatte. Die Lösung war vollständig frei von Schwefelsäure. Nachdem dieselbe mit Brom oxydiert worden war, entstand mit Baryumchlorid ein deutlicher Niederschlag von Baryumsulfat. Die Nährlösung enthält also kurz nach Beginn des Wachstums keine Schwefelsäure, wohl aber eine geringe, aber deutlich nachweisbare Menge niederer durch Brom oxydierbarer Säuren des Schwefels. Zwei Tage später enthielt eine auf gleiche Weise angesetzte Kultur sowohl Schwefelsäure als auch die niederen Säuren." (1912a, p. 23.)

Our own observations indicated that the involvement of products of incomplete reduction of nitrate should also be considered. The supernatant liquid of cultures that had ceased to produce gas invariably contained nitrite. In this connection it is significant that Lieske had concluded that *T. denitrificans* cannot use nitrite in place of nitrate:

„Als bemerkenswerte Tatsache ist hervorzuheben, daß das Nitrat nicht durch Nitrit ersetzt werden kann. Viele denitrifizierende Bakterien reduzieren bekanntlich Nitrit leichter als Nitrat" (1912a, p. 10).

Taken at face value, this statement might be interpreted to imply that nitrate reduction to N_2 by *T. denitrificans* does not proceed *via* nitrite. This is, however, quite contrary to accumulated experience in studies with other denitrifying bacteria, and, as will be shown later, cell suspensions of our strain, grown in nitrate media, are actually capable of reducing nitrite. An alternative explanation of Lieske's results could be based on the assumption that nitrite is toxic to the organism. Lieske drew his conclusion from the failure of *T. denitrificans* to grow in media containing nitrite instead of nitrate, and, although the nitrite concentrations used are not mentioned, it is probable that they were of the same order of magnitude as those in which nitrate was generally employed (0,1—1%). A toxic effect of nitrite, together with the observed accumu-

lation of this substance in our cultures, would evidently account for the two phenomena mentioned at the beginning of this section.

In order to reach a decision between the possible influence of products of incomplete oxidation of thiosulfate and sulfur on the one hand, and of nitrite on the other, a series of experiments was conducted in which cultures of *T. denitrificans* were prepared in media with different concentrations of thiosulfate and nitrate. After 7 days' incubation, when gas production had come to a standstill, the cultures were centrifuged. The supernatant liquids were analysed for residual thiosulfate and for nitrite, and the sedimented bacteria with their admixture of sulfur globules were used for manometric experiments (see below). The results of the thiosulfate and nitrite analyses are presented in Table 1.

Table 1. *Composition and analysis of Thiobacillus denitrificans cultures in media with different amounts of thiosulfate and nitrate.*

		Initial, in grams/100 ml.		Ratio $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O/KNO_3$	$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ residual, g/100 ml.	Nitrite; mg N/100 ml.
		$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	KNO_3			
Exp't.	1	1.0	0.4	2,5	0.076	0.005
I	2	1.0	0.65	1.54	0	0.84
	3	1.0	1.0	1.0	0	1.3
II	1	1.0	0.4	2.5	0.167	0.006
	2	1.0	0.5	2.0	0	0.43
	3	1.0	0.6	1.67	0	0.62
III	1	0.5	0.2	2.5	0.04	0
	2	0.3	0.2	1.5	0	0.06
	3	0.2	0.2	1.0	0	0.033
IV	1	1.0	0.4	2.5	0.144	0
	2	0.8	0.4	2.0	0	0.027
	3	0.6	0.4	1.5	0	0,04
	4	0.4	0.4	1.0	0	0.033

It will be seen that nitrite had not accumulated to an appreciable extent when the nitrate concentration was 0.4% or less, nor in media with more nitrate, provided thiosulfate was present in excess. But in the cultures with 1.0% $Na_2S_2O_3 \cdot 5\,H_2O$, and a thiosulfate:nitrate ratio below 2.5 : 1, nitrite was present, and in amounts inversely proportional to this ratio. If it be assumed that nitrite cannot be used as an oxidant by *T. denitrificans*, these results might, at first sight, suggest that the cultures contained only an apparent excess of nitrate. Its reduction to nitrite, as compared to that to N_2, requires 2.5 times as much nitrate for the oxidation of the same amount of thiosulfate or sulfur. Nevertheless, the quantities of nitrite found are far too small to justify the conclusion that gas production had ceased because of an insufficient supply of oxidant, since a mere 0.1% of the total available nitrate was recovered as nitrite.

The manometric experiments clearly indicated, however, that the accumulated nitrite had exerted an inhibitory effect on the bacteria. Aliquots of comparable cell suspensions, prepared from the sediments of the experimental series I and II, were used to measure the rates of O_2 consumption in air, and of N_2 production from nitrate under anaerobic conditions, respectively. The former was determined with suspensions in which sulfur was the only oxidizable substrate; N_2 evolution was measured with suspensions provided with 25 μm. $Na_2S_2O_3 \cdot 5\ H_2O$ in an O_2-free atmosphere; after thermal equilibration 16 μm. KNO_3 were tipped in.

During the first 40 min the metabolic rates were constant in all cases; soon thereafter the N_2 production by the most active suspensions rapidly declined to zero, owing to the exhaustion of the nitrate supply. This is shown by the fact that the total N_2 evolved, amounting to 178, 171, 179, and 179 μl., respectively, was identical, within the limits of experimental accuracy, with the maximum quantity expected from a quantitative reduction of 16 μm. KNO_3 to N_2 (179 μl.).

The significant data pertaining to these experiments are summarized in Table 2; they demonstrate that cells from cultures in which nitrite had

Table 2. *Rates of O_2-consumption and N_2-evolution by comparable cell suspensions of Thiobacillus denitrificans obtained from the cultures of series I and II (see Table I).*

Cells from Exp't.		Final nitrite conc. in culture medium, in %	μl. O_2 used per 40 min.	% Inhibition	μl. N_2 evolved per 40 min.	% Inhibition
I	1	0.00004	280	—	160	—
	2	0.0051	110	60.7	16	90
	3	0.0079	20	92.8	9	94.4
II	1	0.00004	260	—	160	—
	2	0.0026	270	0	96	40
	3	0.0037	320	0	96	40

accumulated were metabolically less active than those harvested from the virtually nitrite-free cultures. The higher the final nitrite concentration of the culture, the lower was also the activity; and denitrification was more strongly affected than O_2 utilization, indicating that the nitrate-reducing enzyme system is more sensitive to nitrite than that concerned in the activation of O_2.

The various observations so far discussed appear fully consistent with the view that nitrite is a strong inhibitor for *T. denitrificans*. Perhaps the most striking feature is the magnitude of the inhibitory effect; for bacteria harvested from cultures containing as little as 0.003% KNO_2 ($3.5 \cdot 10^{-4}$ m) the inhibition of denitrification amounts to 40%, and it is almost complete when the nitrite concentration has reached approxi-

mately 10^{-3} m. LIESKE's failure to obtain growth of *T. denitrificans* in nitrite media also is readily understandable on this basis; it is practically certain that his culture solutions contained well over 0.01% nitrite.

The inhibitory effect of nitrite on *T. denitrificans* is comparable to that of cyanide on other denitrifying bacteria, for which nitrite does not appear to be particularly toxic. The exceptional response of *T. denitrificans* might be attributed to its obligatory autotrophic nature. However, such a connection appears doubtful because, as will be shown below, the metabolism of the non-denitrifying but equally obligatory autotrophic *T. thioparus* is not measurably influenced by nitrite in much higher concentrations than those which cause a complete inactivation of *T. denitrificans*.

3. The reduction of nitrite by T. denitrificans.

While the preceeding experiments have established that the metabolic activities of *T. denitrificans* are impaired when the cells have been in contact with low concentrations of nitrite, produced over an unknown length of time in the cultures, the following observations show that nitrite inhibition can also be demonstrated as an instantaneous effect.

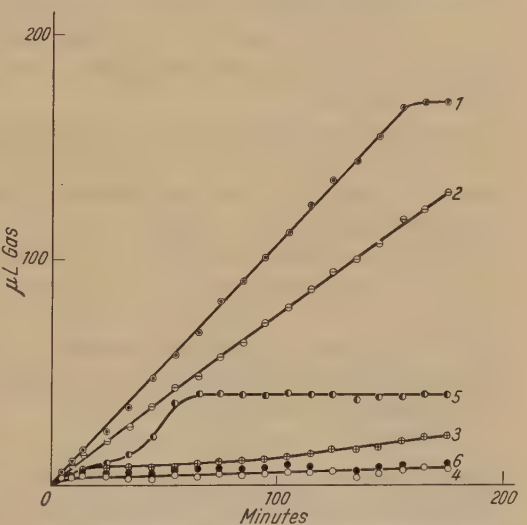


Fig. 4. Reduction of nitrate and nitrite by suspensions of *T. denitrificans*; sulfur as substrate. Added at zero time: Curve *1*: 16 µm. nitrate; Curve *2*: 16 µm. nitrate, and 1 µm. nitrite; Curve *3*: 16 µm. nitrate, and 4 µm. nitrite; Curve *4*: 16 µm. nitrate, and 16 µm. nitrite; Curve *5*: 0 µm. nitrate, and 4 µm. nitrite; Curve *6*: 0 µm. nitrate, and 16 µm. nitrite.

A 2-day old, nitrite-free culture of our strain in a medium with 1% $Na_2S_2O_3 \cdot 5\ H_2O$ and 0.4% KNO_3 was used for the preparation of a cell suspension to which a large excess of colloidal sulfur was added. Evolution of N_2 was measured under anaerobic conditions, following the addition of various amounts of nitrate, nitrite, and mixtures of these substances to aliquots of the suspension. The results, presented in Fig. 4, demonstrate conclusively that the rate of gas evolution from nitrate was approximately 30% less when 1 µm. nitrite (final concentration *c.* $5 \cdot 10^{-4}$ m) was added together with 16 µm. nitrate (curves 1 and 2); a 4-fold larger

amount of nitrite caused a 90% inhibition (curve 3). Thus, the extent of the immediate inhibition was of the same order of magnitude as that observed in the earlier experiments.

Comparison of the behavior of the cells in the presence of 4 μm. nitrite alone (curve 5) with that in the presence of the same amount of nitrite and an additional 16 μm. nitrate (curve 3) reveals that in the former case the nitrite was completely reduced to N_2 after about 60 min; the amount of gas liberated (40 μl.) corresponds closely with that required theoretically (45 μl.; it should be emphasized here that the nitrite used in this and subsequent experiments had not been dried or otherwise purified, and a moisture content of approximately 10% appears plausible). The gradual increase in the rate of gas production suggests that an initial inhibition was gradually overcome, presumably owing to the disappearance of the nitrite. On the other hand, the N_2 evolution by the suspensions supplied with 16 μm. nitrate and 1 or 4 μm. nitrite (curves 2 and 3) proceeded at a constant rate for at least three hours; this suggests that the added nitrite was not reduced as long as nitrate was present.

At nitrite concentrations of 16 μm. per flask (final concentration about 0.05%) gas production was negligible, both in the presence and in the absence of nitrate.

These experiments directly confirm the conclusion that nitrite is a strong inhibitor of the denitrifying enzyme system of *T. denitrificans*, a property which can explain Lieske's results without invoking the hypothesis that nitrate reduction does not proceed *via* nitrite. In fact, both the accumulation of nitrite in nitrate media, and the ability of *T. denitrificans* to produce N_2 from nitrite, provided this is present in low enough concentration, argue rather in favor of the more conventional view.

Studies similar to those discussed above have also been conducted with cell suspensions in the presence of thiosulfate. Here, to our surprise, an entirely different behavior was observed.

Fig. 5 illustrates the gas production by cell suspensions supplied with 25 μm. thiosulfate and various amounts of nitrate and nitrite. Curves 4 and 5 show that nitrite, even in the highest concentration, is rapidly decomposed; 4 μm. nitrite disappeared in about 10 min, 16 μm. in 35 min. Since the decomposition of 16 μm. nitrate was completed in 30 min (curve 1), the rate of utilization of nitrite and nitrate were approximately the same.

The first parts of the curve pairs 2 and 4, and 3 and 5, are superimposable. Because curves 4 and 5 represent gas production from nitrite alone, it follows that in suspensions with both nitrite and nitrate the decomposition of nitrite takes precedence over that of nitrate, contrary to what was observed in the experiments with sulfur as the oxidation substrate. The secondary gas production by suspensions to which both

nitrite and nitrate had been added must obviously be ascribed to the denitrification of nitrate, and the total gas production during this second phase, calculated as N_2, supports this conclusion. From 16 μm. nitrate alone 186 μl. N_2 were formed (curve 1; theoretical value 179 μl.); in the experiment with 4 μm. added nitrite the secondary gas evolution amounted to 185 μl., and in that with 16 μm. nitrite to 177 μl. But the nitrate utilization was slower when nitrite had previously been decomposed; the times required were 30, 85, and 150 min, respectively, for the

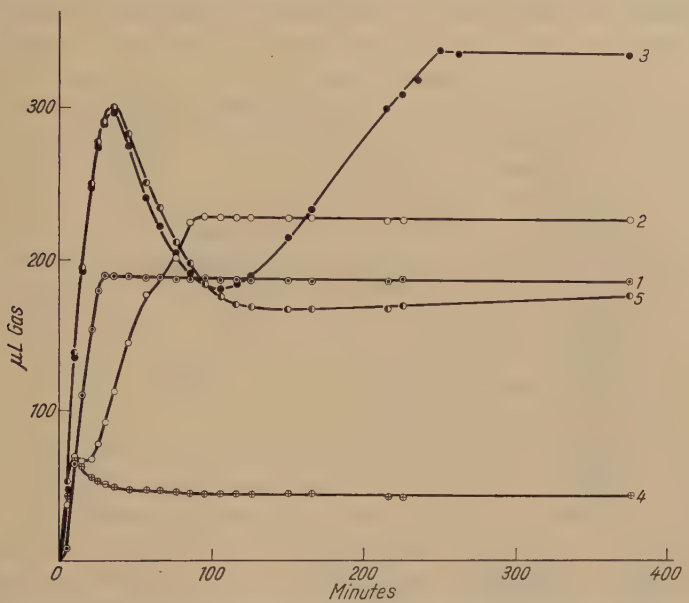


Fig. 5. Reduction of nitrate and nitrite by suspensions of *T. denitrificans*; 25 μm. thiosulfate added at zero time, together with: Curve *1*: 16 μm. nitrate; Curve *2*: 16 μm. nitrate, and 4 μm. nitrite; Curve *3*: 16 μm. nitrate, and 16 μm. nitrite; Curve *4*: 0 μm. nitrate, and 4 μm. nitrite; Curve *5*: 0 μm. nitrate, and 16 μm. nitrite.

suspensions to which initially 0, 4, and 16 μm. had been added along with the nitrate. Hence the temporary presence of nitrite had evidently caused a partial inactivation of the nitrate-reducing enzymes. Since the rate of gas production from nitrate was practically constant, the inactivation is apparently not reversible, at least over a period of 150 min.

The curves of gas production from nitrite suggest the occurrence of two consecutive and opposite types of reaction: a primary, rapid one in which gas is evolved, and a secondary, slower one in which gas is used. There can be little doubt that the ultimate gaseous product is N_2; this follows from the close correspondence between the observed final values for gas evolved (42 and 171 μl. from 4 and 16 μm. nitrite, respectively), and the theoretically possible amounts of N_2 (45 and 179 μl.).

Since the primary, rapid gas formation was not observed in the absence of thiosulfate, our first attempts to interpret the nature of the two reactions were concerned with the question whether the initial process is a purely chemical or a biological one. Experiments showed that in the absence of bacteria no measurable gas production occurred when nitrite was added to a thiosulfate solution, and that the rate of gas evolution was a function of the density of the bacterial suspension. This is illustrated by Fig. 6; it may be noted that the relationship is not strictly linear. The deviations for the high cell concentrations can be ascribed to the very

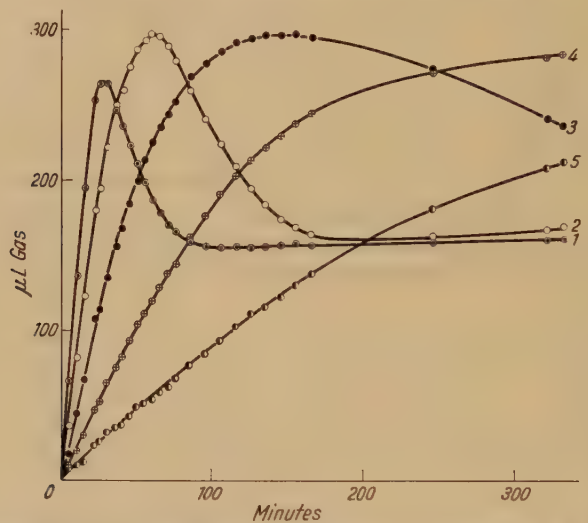


Fig. 6. Reduction of nitrite in the presence of thiosulfate by suspensions of *T. denitrificans* of different cell density; 25 µm. thiosulfate and 16 µm. nitrite added at zero time. Cell density, in arbitrary units, for curves *1* to *5*, respectively: 100, 30, 10, 3, and 1.

high rates of gas production, amounting to 100 µl. or more per 10 min; in such cases there is usually a lag between gas production and registration of the pressure changes on the manometer. At the lower densities the deviations are probably due to the simultaneous but proportionally different occurrence of the two opposite reactions; the data are insufficient to settle this point, however.

It was further established that the effect of p_H on the primary reaction is similar to that on nitrate reduction; in alkaline suspensions the rate as well as the extent of the initial gas formation is markedly less than in slightly acid ones.

Addition of $HgCl_2$ to suspensions with nitrite and thiosulfate prevents gas liberation provided enough $HgCl_2$ is used. A final concentration of 0.1% in the suspension, which prevents nitrate reduction in the presence of thiosulfate, does not influence the primary gas production from nitrite,

and only partially inhibits the secondary process. If the final concentration of $HgCl_2$ is raised to 1%, these reactions are, however, eliminated. These results indicate a greater sensitivity of the nitrate- than of the nitrite-reducing enzyme system; the former is also most sensitive to cyanide, as shown in earlier studies with other denitrifying bacteria (see, *e.g.*, ALLEN a. VAN NIEL, 1952).

Although a direct chemical interaction between thiosulfate and nitrite had thus been ruled out, the possibility remained that the initial gas production might have resulted from a spontaneous chemical reaction between the nitrite and intermediate products of thiosulfate oxidation. This was tested by using *T. thioparus* instead of *T. denitrificans* as the agency to produce such substances from thiosulfate. While in many respects quite similar to *T. denitrificans*, *T. thioparus* lacks the ability to reduce nitrate and nitrite; it was, however, assumed that the oxidation of thiosulfate would proceed much in the same manner under the influence of the two sulfur bacteria. Aliquots of a sulfur-free suspension of *T. thioparus* were distributed over a number of reaction flasks, provided with KOH in the center wells, and 25 μm. thiosulfate, or a mixture of 25 μm. thiosulfate and 16 μm. nitrite, in a side arm. The gas phase was air. After thermal equilibration the contents of the side arms were mixed with the suspensions, and the pressure changes recorded. The suspensions with and without nitrite behaved identically, and the final gas consumption, calculated as O_2, was exactly 50 μm. in all cases, the amount theoretically required for the complete oxidation of the added thiosulfate. It must therefore be concluded that nitrite has no effect on thiosulfate oxidation by *T. thioparus*, and hence the occurrence of a spontaneous reaction between nitrite and intermediate products of thiosulfate oxidation appears unlikely.

Next we turned our attention to the chemical nature of the gas produced during the initial phase of the nitrite decomposition by *T. denitrificans*. *A priori* it was expected to represent a nitrogenous substance because the volatile sulfur compounds that might conceivably arise from the sulfur or thiosulfate in the suspensions are all acidic, and should thus have been absorbed by the alkali present in the center wells of the reaction flasks. From the fact that approximately 1 mol of gas was initially liberated per mol of nitrite added, it was obvious that the gaseous substance could not contain more than a single nitrogen atom per molecule. This suggested that the product in question was NO whose evolution during denitrification has occasionally been reported (see, *e.g.*, VERHOEVEN, 1952).

Nitric oxide is absorbed by an alkaline sulfite solution; the reaction responsible for this phenomenon is:

$$K_2SO_3 + 2\,NO \rightarrow K_2SO_4 \cdot N_2O,$$

and the addition product decomposes on acidification to sulfate and N_2O. We have used these properties as a means of establishing the nature of the first gaseous product.

A representative experiment was performed as follows:

Equal aliquots of a dilute suspension of *T. denitrificans* were distributed over a number of reaction flasks, each receiving a mixture of 25 μm. thiosulfate and 16 μm. nitrite in one side arm. Flask 1 served as a control; here the center well contained KOH. In flask 2 the center well was provided with an alkaline sulfite solution (1.25 m K_2SO_3, 0.25 m KOH), absorbed on a fringed roll of filter paper in order to increase the surface, and hence the efficacy of the absorption. A solution

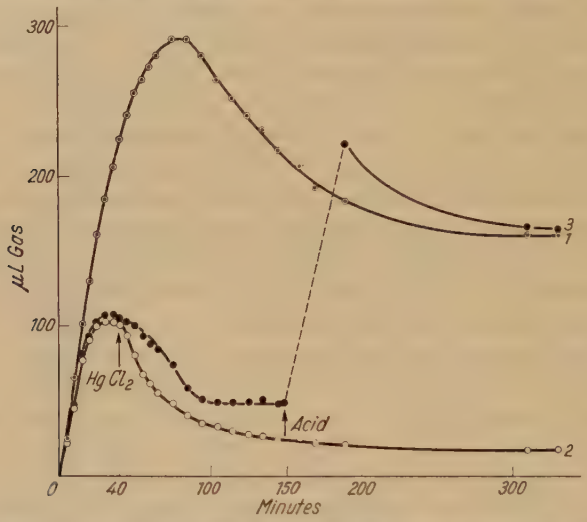


Fig. 7. Reduction of nitrite in the presence of thiosulfate by suspensions of *T. denitrificans* under different conditions; 25 μm. thiosulfate and 16 μm. nitrite added at zero time. Curve *1*: Gas production in Control. Curve *2*: Gas production with alkaline sulfite in center well; $HgCl_2$ added after 40 minutes. Curve *3*: Gas production with alkaline sulfite in side arm; H_2SO_4 added to sulfite solution after 150 minutes.

of $HgCl_2$ was placed in the second side arm. Flask 3 contained KOH in the center well, and the alkaline sulfite solution in the second side arm which was closed with a vented stopper. The gas phase was composed of O_2-free N_2.

After thermal equilibration ("zero time") the thiosulfate and nitrite were tipped into the bacterial suspensions; 40 minutes later the $HgCl_2$ solution was added to the cells in flask 2. Two and a half hours after the beginning of the experiment flask 3 with the attached manometer, the latter closed with a cork at the open end, was temporarily removed from the water bath, and an excess H_2SO_4 added to the alkaline sulfite solution in the side arm through the vented stopper. (For details concerning manipulations and computations pertaining to this kind of experiment see Schatz, 1952).

Fig. 7 shows the results of such an experiment; they permit the following conclusions.

The behavior of the control was normal; the initial gas production (292 μl., calculated as N_2) was followed by a gradual decrease in pressure

until a stationary state was reached representing a total gas production of 160 μl. (theoretically, 179 μl. N_2 from the 16 μm. nitrite added).

In the presence of alkaline sulfite gas evolution occurred for a short time only; it reached a maximum when the quantity was about one-third of that in the control. After inactivation of the cells through the addition of $HgCl_2$ (curve 2) the evolved gas was nearly completely absorbed. This indicates that the major gaseous product was NO, released faster than it could be absorbed from the gas phase by the sulfite. The behavior of the suspension to which $HgCl_2$ had not been added (curve 3) was similar; 100 min after the start of the experiment the pressure here had dropped to a constant but somewhat higher value. This result is compatible with a rapid initial liberation of NO, partly absorbed by the sulfite, and partly reduced by the bacteria to N_2. Acidification of the sulfite solution after 150 min produced a burst of gas, probably composed of N_2O, CO_2, and SO_2; the last two components would be gradually absorbed by the KOH, and the first one reduced to N_2 by the cells. The final quantity of gas evolved (163 μl.) agrees well with the amount of N_2 produced in the control (160 μl).

In order to determine more accurately the nature of the initial gaseous product an experiment was performed as follows:

Three reaction flasks were provided with equal aliquots of a suspension of *T. denitrificans*, KOH in the center wells, a mixture of 25 μm. thiosulfate and 16 μm. nitrite in one side arm, and $HgCl_2$ in the other. The gas phase consisted of O_2-free N_2. The substrates were tipped in after thermal equilibration, whereupon the usual rapid gas evolution ensued. After 45, 75, and 100 minutes, respectively, the $HgCl_2$ solution was added to the suspensions in flasks 1, 2, and 3, thereby preventing any further biological activity.

The quantities of NO produced prior to the addition of $HgCl_2$ were determined by introducing, 135 min after the start of the experiment, an alkaline sulfite solution through the vented stoppers into a side arm. In all cases the pressure decreased, and the extent was recorded. When no more gas was absorbed, acid was added to the sulfite solutions as before; the amount of N_2O liberated was measured after the pressures had become constant. The data for this experiment are listed in Table 3. In view of the complicated experimental procedure the agreement between

Table 3. *Nitric oxide production from nitrite by T. denitrificans.*

Flask No.	$HgCl_2$ added after minutes	μl. NO + N_2 after 135 min.	Residual N_2 after absorption of NO, μl.	μl. NO absorbed	μl. N_2O after acidification	μl. N_2O calculated from NO values
1	45	228	4	224	127	112
2	75	268	10	258	123	129
3	100	280	41	239	110	119

the values in the last two columns, representing the amounts of N_2O found and computed from the quantities of NO absorbed, respectively, may be deemed fully satisfactory.

After thus having established that the gas evolved during the early phase of the nitrite decomposition was indeed NO, it became necessary to test the ability of *T. denitrificans* to use this substance as an oxidant for substrate oxidation. Only on the basis of such a reaction could the drop in pressure observed during the secondary phase be explained.

For this purpose NO was generated in the flask-manometer combinations from the interaction between nitrite and iodide, according to the reaction:

$$KNO_2 + KJ + H_2SO_4 \rightarrow K_2SO_4 + J + NO + H_2O \text{ (Gmelin, 1936).}$$

That this reaction can be used to produce a known amount of NO was demonstrated as follows.

Solutions of KJ (100 μm.) and of nitrite (16 μm.) were introduced into the main compartment of a reaction flask which contained 16 μm. H_2SO_4 in a side arm. The gas phase was O_2-free N_2. After equilibration the acid was tipped into the main compartment; this resulted in a rapid evolution of gas which had terminated in about 5 minutes. The quantity of NO formed (346 μl.) agreed, within the limits of experimental accuracy, with that required by the equation (358 μl.). The use of an excess of KJ and of an amount of H_2SO_4 equivalent to that of nitrite prevents the formation of other gaseous products.

The same approach was used in experiments with cell suspensions of *T. denitrificans*, placed in the main compartment of the flasks. Here, the iodide-nitrite solution was present in a side arm with vented stopper, and generation of NO was accomplished by adding H_2SO_4 to the side arm contents through the vent.

The first of these experiments were performed with cell suspensions containing only sulfur as oxidizable substrate. The results showed convincingly that NO was used by the bacteria, although the rate of its reduction was less than that observed during the secondary phase in the earlier experiments, where an excess of thiosulfate was present; this is in line with the before-mentioned fact that the rate of nitrate reduction is also lower with sulfur than with thiosulfate as substrate.

By an extension of these experiments it was further shown that cell suspensions, which had first been made to reduce 16 μm. NO over a period of 200 min, immediately afterwards decomposed a thiosulfate-nitrate or thiosulfate-nitrite mixture in exactly the same manner, and at identical rates, as did comparable cell suspensions not previously exposed to NO. Hence it can be inferred that NO does not inactivate the enzymes concerned in the denitrification process of *T. denitrificans*.

Perhaps the most convincing demonstration that during the initial decomposition of nitrite and thiosulfate NO is evolved, and that subsequently the substrate oxidation is coupled with a further reduction of NO, is furnished by the experiment illustrated in Fig. 8. Two flasks, each

containing equal aliquots of a cell suspension and 25 μm. thiosulfate, were used; after equilibration 16 μm. nitrite were added to the suspension in one flask, while in the other NO was generated chemically from the same amount of nitrite present in a side arm. The curves representing the changes in gas pressure are strikingly similar; this seems compelling evidence for the conclusion that the same reactions were proceeding in the two flasks.

Because suspensions of *T. denitrificans* produced NO from mixtures of nitrite and thiosulfate, but not from nitrite and sulfur, we have examined the quantitative relations between NO evolution and the concentrations of nitrite and thiosulfate. For this purpose equal aliquots of a cell suspension were mixed with 16 μm. $NaNO_2$ and 6, 8, 10, and 12 μm. thiosulfate, respectively. Rapid gas production occurred in all cases; calculated as NO, the corresponding amounts observed were 6.1, 7.8, 9.5, and 10.7 μm. The equivalence between NO formation and thiosulfate

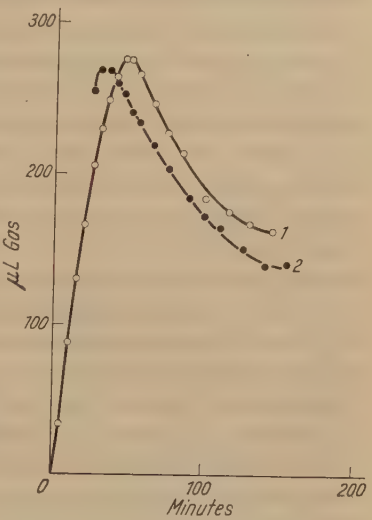


Fig. 8. Gas production and absorption by suspensions of *T. denitrificans*. Curve *1*: 25 μm. thiosulfate and 16 μm. nitrite added at zero time. Curve *2*: 25 μm. thiosulfate added at zero time, and 16 μm. NO generated chemically in side arm.

added suggests that the reaction proceeds according to the equation:

$$2\ Na_2S_2O_3 + 2\ NaNO_2 + 2\ H_2O \rightarrow Na_2S_4O_6 + 2\ NO + 4\ NaOH.$$

The further observation that tetrathionate, added together with nitrite to a suspension of the bacteria, does not cause NO formation supports this view.

4. The assimilation of carbon dioxide.

The studies of Beijerinck and Lieske, as well as our own, have established that *T. denitrificans*, like *T. thioparus* and *T. thiooxidans*, must be regarded as an obligatory chemo-autotrophic bacterium. It can grow only in media supplied with an oxidizable sulfur compound, and synthesizes its cellular constituents from CO_2 as the sole carbon source.

It has also been found that CO_2 assimilation can be demonstrated for all three species in experiments of short duration with resting cell suspensions. Details of procedure and results have been published elsewhere

(Baalsrud a. Baalsrud, 1952); suffice it here to mention that the extent of CO_2 assimilation observed under such conditions is of the same order of magnitude as that encountered in growing cultures, and that, computed on the basis of a unit quantity of substrate oxidized, *T. denitrificans* assimilates approximately twice as much CO_2 as do the non-denitrifying members of the genus.

We have extended the investigations on CO_2 assimilation by *T. denitrificans* in two directions. In the first place, a comparative study has been made of CO_2 assimilation by resting cell suspensions containing either sulfur alone, or both sulfur and excess thiosulfate as oxidizable substrates. The conditions were anaerobic, oxidative metabolism being initiated by the addition of limiting quantities of nitrate as oxidant. In general, the methodology was that described in our earlier publication to which reference is made. The results showed that the CO_2 uptake coincident with the complete reduction of 16 μm. nitrate amounted to 5.2 and 4.0 μm. for the suspensions oxidizing sulfur and thiosulfate, respectively. Since it was known from previous experiments that thiosulfate is oxidized more rapidly than sulfur, it may therefore be concluded that the smaller value for the thiosulfate-containing suspensions implies a less efficient CO_2 assimilation during thiosulfate- than during sulfur oxidation.

This difference in efficiency may be accounted for by assuming that the free energy, released by some component step in the sequence of reactions through which the oxidation of thiosulfate proceeds, is not available for assimilatory purposes, because the magnitude of the change is too small for the establishment of a requisite potential or for the formation of a high-energy bond. Alternatively, the energy, though thermodynamically sufficient, might not be transferable for lack of an appropriate coupling mechanism.

Now it appears attractive to consider the first step in the oxidation of thiosulfate, *viz.* the formation of tetrathionate, as a reaction of this kind, and for the following reason. During the early stages of the present investigation we isolated several organisms from crude cultures of *T. denitrificans* which are capable of oxidizing thiosulfate to tetrathionate, but incapable of oxidizing the latter. Such bacteria have been encountered before (see especially Sijderius, 1946); they require organic substances for growth. We have used pure cultures of these strains to determine the cell yields in media with severely limiting quantities of organic substances, both in the presence and in the absence of thiosulfate. If oxidation of thiosulfate to tetrathionate could yield energy in a form utilizable by the cells, one should anticipate greater cell crops from the thiosulfate-containing than from the thiosulfate-free media. This is not the case; the density of companion cultures has always been found identical.

Assuming that *T. denitrificans* also cannot utilize the energy liberated in this first oxidation step, a „corrected" efficiency for CO_2 assimilation can be calculated. From the equations:

$$2\ Na_2S_2O_3 + H_2O + O \rightarrow Na_2S_4O_6 + 2\ NaOH$$

and

$$2\ Na_2S_2O_3 + 2\ H_2O + 8\ O \rightarrow 4\ NaHSO_4\,,$$

it is evident that the „waste" should amount to 1/8 the quantity of oxidant used. Multiplication of the observed CO_2 uptake during thiosulfate oxidation by 8/7 should then yield a value more strictly comparable with that obtained for CO_2 assimilation during sulfur oxidation. However, even this „corrected" figure is smaller (4.57 *vs.* 5.2 μm. CO_2).

But our computation implies the tacit assumption that the reduction of the added nitrate had been accompanied by a corresponding oxidation of thiosulfate to sulfate. That this is not always true is shown, for example, by the data of Table 1; the amounts of nitrate present were much too small to have permitted an oxidation to sulfate of the thiosulfate utilized (see, especially, experiments I, 1; II, 1; III, 1; IV, 1). When an excess of thiosulfate over oxidant is present, one may, therefore, have to reckon with an oxidation of the substrate to intermediate products.

Such a condition was realized in the experiment used for the determination of CO_2 assimilation (25 μm. thiosulfate and 16 μm. nitrate). If we postulate that all of the thiosulfate had first been oxidized to tetrathionate, an amount of nitrate equivalent to $25/2 = 12.5$ μA. oxygen was spent on this „useless" oxidation, leaving an equivalent of $40 - 12.5 = 27.5$ μA. oxygen for subsequent oxidation reactions. Correction for the „wasted" oxidation thus would involve multiplication of the observed CO_2 assimilation by the factor 40/27.5; the „corrected" value, 5.82 μm. CO_2, now is larger than that found in the experiment with sulfur as the substrate. Obviously, oxidation of only a fraction of the thiosulfate to tetrathionate, and of a smaller fraction to sulfate, could yield a „corrected" value for CO_2 assimilation identical with that observed during sulfur oxidation. Owing to the lack of information concerning the nature and quantities of the products of thiosulfate oxidation in these experiments, it is not yet possible to put the above speculations to a rigorous test.

From the quantitative relations between thiosulfate oxidized, O_2 used, and CO_2 assimilated by sulfur-free, resting cell suspensions of the non-denitrifying *T. thioparus* and *T. thiooxidans* we have concluded (Baalsrud a. Baalsrud, 1952) that the assimilated CO_2 was actually reduced to a stage approximating the composition of carbohydrate. The experiments with *T. denitrificans* were, however, performed with cell suspensions containing a large amount of sulfur, and in a previous section we have pointed out that under these circumstances no inference concerning the

fate of the assimilated CO_2 can be drawn. It is true that the extent of CO^2 uptake by the resting cells was of the same order of magnitude as that observed with growing cultures, where obviously a far-reaching reduction must occur. Since, furthermore, the CO_2 assimilation by resting cells of *T. thioparus* and *T. thiooxidans* also corresponds closely to that measured in growth experiments with these organisms, it seems reasonable to conclude that resting cells of *T. denitrificans*, too, convert the absorbed CO_2 into organic compounds other than mere carboxylation products.

That this is true was demonstrated directly with a cell suspension to which 25 μm. thiosulfate, 16 μm. nitrate, and 5 μm. $Na_2C^{14}O_3$ were added. After 40 min, when all the nitrate had been reduced to N_2, an excess of acetic acid was tipped into the main compartment, thus inactivating the cells,and releasing residual CO_2. The latter was absorbed by KOH, introduced into a side arm through the vented stopper, over a period of 2 hours; finally, the suspension was removed from the reaction flasks, and examined in the following manner.

An aliquot of the suspension was dried on a disc, and its C^{14} content determined with a Geiger-Müller counter. The remainder of the suspension was centrifuged, and the radioactivity of the supernatant liquid measured. The sediment was extracted consecutively with boiling water and with methanol, and the radioactivity of the two extracts and of the residual cells estimated. In this way it was established that 49% of the total C^{14} content of the suspension was present in the supernatant liquid, 4% and 1%, respectively, in the water and methanol extracts of the cells, and 46% in the cell residue. This last fraction is presumably composed of high-molecular compounds of low solubility, and the quantity indicates that almost one-half of the assimilated CO_2 had found its way into these complex substances during the assimilation period of 40 min. The other half, recovered in the supernatant liquid, probably contains the low-molecular, early assimilation products; they may have been extracted from the cells by the acidified solution during the 2 hours needed for absorption of excess CO_2 by the KOH. So far, the chemical nature of the various radioactive components has not been determined. Nevertheless, the results of this simple experiment show convincingly that enough CO_2 is fixed so that an analysis of the assimilatory mechanism in *T. denitrificans* with the techniques developed by Calvin and collaborators (1951) for the study of the gradual transformation of CO_2 in photosynthesis is certainly feasible.

Summary.

Experiments with *T. denitrificans* have shown that this bacterium cannot develop in media devoid of ammonium salts, and that iron is required for growth. Pure cultures have been isolated by means of a

modified medium which permits rapid growth in serial transfers. The organism has been characterized as an obligatory chemoautotroph which can oxidize a number of inorganic sulfur compounds (elementary sulfur, thiosulfate, tetrathionate) either aerobically with O_2, or anaerobically with nitrate as oxidant.

Nitrite was found to be highly toxic to the nitrate-reducing enzyme system; concentrations as low as $3.5 \cdot 10^{-4}$ m inhibit denitrification in the presence of sulfur about 40%. In the presence of thiosulfate, nitrite is rapidly decomposed to NO; this gas can subsequently be used as an oxidant, and is reduced to N_2. The formation of NO depends on the presence of both thiosulfate and nitrite.

With resting cell suspensions CO_2 assimilation has been established; the assimilation products are not merely carboxylation products, as demonstrated in experiments with $C^{14}O_2$.

Acknowledgement.

These studies were aided by grants from the Royal Norwegian Council for Scientific and Industrial Research.

We are very grateful to Dr. C. B. van Niel for his many helpful criticisms and suggestions during the course of this work and during the writing of the manuscript.

References.

Allen, M. B., and C. B. van Niel: Experiments on bacterial denitrification. J. Bacter. **64**, 397 (1952).

Baalsrud, K., and K. S. Baalsrud: The role of phosphate in CO_2 assimilation of thiobacilli. In: Phosphorus Metabolism, II, 544. Baltimore: The Johns Hopkins Press 1952. — Beijerinck, M. W.: Phénomènes de réduction produits par les microbes. Arch. Néerland. Sci. Exactes et Naturelles, Série 2, **9**, 131 (1904); Über das Nitratferment und über physiologische Artbildung. Folia Microbiologica, Delft **3**, 91 (1914); Chemosynthesis at denitrification with sulfur as source of energy. Proc. Sec. Sci., Amsterdam: Koninkl. Akad. Wetensch. **22**, 899 (1920).

Calvin, M., J. A. Bassham, A. A. Benson, V. H. Lynch, C. Quellet, L. Schou, W. Stepka, and N. E. Tolbert: Carbon dioxide assimilation in plants. In: Carbon dioxide fixation and photosynthesis. Symp. Soc. Exper. Biol. **5**. New York: Acad. Press, Inc. 1951.

Gehring, A.: Beiträge zur Kenntnis der Physiologie und Verbreitung denitrifizierender Thiosulfat-Bakterien. Zbl. Bakter., Abt. 2, **42**, 402 (1915). — Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie. 8. Aufl., System Nr. 4, Liefer. 3. 1936.

Kingma Boltjes, T. Y.: Nitrifying bacteria. Arch. Mikrobiol. **6**, 79 (1935).

Lieske, R.: Untersuchungen über die Physiologie denitrifizierender Schwefelbakterien. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss. Math.-naturwiss. Kl., B. 6. (1912a); Untersuchungen über die Physiologie denitrifizierender Schwefelbakterien. Ber. dtsch. bot. Ges. **30**, 12 (1912b).

Nathansohn, A.: Über eine neue Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel. Mitt. zool. Sta. Neapel **15**, 655 (1902).

Rusakova, G. S., and V. S. Butkevich: Denitrification by bacteria without the use of nitrates as nitrogen source. Microbiologija (U.S.S.R.) **10**, 137 (1941).

Sato, R., and F. Egami: Studies on nitrate reductase, III. Bull. Chem. Soc. Japan **22**, 137 (1949). — Sato, R., and M. Niwa: Studies on nitrate reductase, VII.

Reinvestigation on the identity of the enzyme with cytochrome b. Bull. Chem. Soc. Japan **25**, 202 (1952). — Schatz, A.: Uptake of carbon dioxide, hydrogen and oxygen by *Hydrogenomonas facilis*. J. Gen. Microbiol. **6**, 329 (1952). — Sijderius, R.: Heterotrophe bacterien, die thiosulfaat oxydeeren. Diss. Amsterdam (1946). — Starkey, R. L.: Cultivation of organisms concerned in the oxidation of thiosulfate. J. Bacter. **28**, 365 (1934); Products of the oxidation of thiosulfate by bacteria in mineral media. J. Gen. Physiol. **18**, 325 (1935a); Isolation of some bacteria which oxidize thiosulfate. Soil Sci. **39**, 197 (1935b).

Tiulpanova-Mosevich, M. V.: Denitrifikation auf dem anorganischen Nährboden. Arkh. Biol. Nauk. **30**, 203 (1930).

Verhoeven, W.: Aerobic sporeforming nitrate reducing bacteria. Delft: Waltman 1952. — Vishniac, W.: On the metabolism of the chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus thioparus* Beijerinck. Ph. D. Thesis, Stanford University 1949; The metabolism of *Thiobacillus thioparus*. I. The oxidation of thiosulfate. J. Bacter. **64**, 363 (1952).

Winogradsky, S.: Microbiologie du sol; Problèmes et méthodes. Oeuvres complètes. Paris: Masson et Cie. 1949.

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 63—88 (1954).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen.)

Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Neutralsalze auf Wachstum, Zellform und Fadenbildung von Stichococcus bacillaris und einigen anderen Grünalgen*.

Von

Brigitte Schröder, geb. Tornau.

Mit 18 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. Oktober 1953.)

Es ist schon wiederholt festgestellt worden, daß die Konzentration der Nährlösung (Beyerinck, 1893, Senn, 1899, Livingston, 1900, Rayss, 1915), das Alter der Kulturen und gewisse Ernährungsbedingungen (Klebs, 1896, Klercker, 1896, Grossmann, 1912) sowie antibiotische Faktoren (Lefèvre, Jakob u. Nisbet, 1952) von Bedeutung dafür sind, ob gewisse Algen sich als Fäden oder als Einzelzellen entwickeln. Auch bestimmte Salze können dabei eine Rolle spielen, wie Rayss (1915), Sakamura (1924) und, besonders eingehend, Vischer (1926) ermittelt haben. Nach Vischer spielt die Stellung der Ionen in der Hofmeisterschen Reihe eine Rolle; quellende Ionen begünstigten danach die Einzelzellenbildung, die entquellenden die Fadenbildung. Der Zusammenhalt der Zellen war in Kulturen mit Zusatz von Erdalkalien weit stärker als mit Alkalizusatz; von den Anionen wirkten die Chloride und Sulfate den Nitraten gegenüber stärker quellend.

Weit zahlreicher sind die Angaben über die Formveränderung der einzelnen Zelle. Am häufigsten sind auch hier wieder Versuche mit verschiedenen Nährlösungskonzentrationen (Famintzin, 1872, Richter, 1892, Livingston, 1900, 1901, 1905, Artari, 1904, 1906, Chodat, 1909, 1926, Issatschenko, 1911, Grossmann, 1912, Andreesen, 1913, Rayss, 1915, Vischer, 1920, Freund, 1923, Hartmann, 1924, Gistl, 1932). Im allgemeinen trat in höheren Konzentrationen bei *Scenedesmus*, *Coelastrum* und anderen Algen Abrundung der Zellen ein. Auch die Größe der Zellen änderte sich in manchen Fällen mit Änderung der Substratkonzentration (Richter, 1892, Artari, 1904, 1906, Chodat, 1909, Issatschenko, 1911, Freund, 1923, Hartmann, 1924, Gistl, 1932). Häufig finden sich auch Angaben über Formveränderungen wie Zellverbiegungen, Rückbildung von Stacheln und ähnliche Erscheinungen, die von den Beobachtern in der Regel auf zugesetzte Chemikalien, Konzentration der Nährsalze oder ähnliche äußere Wirkungsfaktoren zurückgeführt werden (Migula, 1888, Klebs, 1896, Klercker, 1896, Gerneck, 1907, Gistl, 1932).

Die Literatur über diesen Gegenstand ist damit nicht völlig erschöpft. Aber bereits dieser Überblick zeigt, daß verschiedene Algenformen stark auf äußere Reize zu reagieren vermögen. Das gilt auch für *Stichococcus bacillaris* Naeg., von dem im folgenden untersucht werden soll, wie er sich in seinem Wachstum, seiner Fadenbildung und seiner Zellform gegen-

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.

über der Einwirkung verschiedener Neutralsalze wie auch der Hydratur (vgl. Burcik, 1950) verhält. Übrigens sind neuerdings Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Neutralsalze auch auf die Faden- und Kettenbildung bei Bakterien gemacht worden (Heinzel, 1948).

I. Experimenteller Teil.

A. Methodik.

Die Algenkulturen stammen aus der Sammlung von Prof. E. G. Pringsheim-Cambridge (jetzt Göttingen). Die Hauptversuchsalge (Nr. 379/*1b*) ist der gleiche Stamm, mit dem auch schon Vischer (1926) seine Versuche angestellt hat.

Alle Lösungen wurden in Aqua bidest. aus einem Heraeusschen Quarzdestillierapparat hergestellt, alle verwendeten Salze waren „pro analysi". Als Nährlösung erwies sich die von Benecke (1898) angegebene mit kleinen Veränderungen als geeignet: Aqua bidest. 1000 g; darin K_2HPO_4 0,2 g = 0,0012 mol; $Ca(NO_3)_2$ 0,5 g = 0,0050 mol; $MgSO_4$ 0,1 g = 0,0008 mol. Statt $FeCl_3$ wurde gepuffertes Eisencitrat zugesetzt und zwar 5 cm³ einer Lösung von 0,1% Eisencitrat + 0,1% Citronensäure auf 1000 g Aqua bidest. Die im ganzen 0,08%ige Benecke-Lösung wurde im allgemeinen auf das 10fache verdünnt (0,008% = 0,0007 mol/Liter); die Nährlösung wurde in Reagensgläsern mit der frisch hergestellten Lösung der in der Wirkung zu prüfenden Salze versetzt. Stets wurden 3 Parallelkulturen und 3 Kontrollen mit reiner Nährlösung angesetzt. Alle Gefäße waren aus Jenenser Glas.

Geimpft wurde aus einer 4 Wochen alten Kultur, in der die *Stichococcus*-Zellen einheitlich 3 μ breit und 6—10 μ lang waren (je Reagensglas der Inhalt einer Platinöse). Danach wurde die für Petri-Schalen bestimmte Nährlösung aus den Reagensgläsern in die trocken sterilisierten Petrischalen gegossen.

Der p_H-Wert (mit Mercks Indicatorpapier gemessen) lag bei den meisten Kulturen wie auch bei der 0,008%igen Kontrollnährlösung bei 5,9. Da die Genauigkeit der Bestimmung bei ungefähr 0,2 p_H liegt, konnten deutliche Abweichungen nur bei den Kulturen mit 0,1 mol KNO_3 = 6,8 p_H und 0,1 mol K_2SO_4 = 6,5 p_H beobachtet werden. Die p_H-Werte änderten sich bei den 4tägigen Messungen nicht. Ihre Wirkung auf das Wachstum der Kulturen blieb also in allen Fällen gleich.

Die Entwicklung der Kulturen wurde zum erstenmal 8 Tage nach der Impfung untersucht, danach noch 3- oder 4mal im Abstand von je 4 Tagen. Zur mikroskopischen Bewertung wurden die Reagensglaskulturen einmal schwach umgeschüttelt und eine Probe der Algen mit der Platinöse in eine Tomé-Zählkammer gebracht; das ganze Feld von $^1/_{400}$ mm³ wurde ausgezählt (von jeder Kultur 6 Proben). Von den Petrischalen, die direkt unter das Mikroskop gebracht werden konnten, wurden 6 Okularzählfelder von 0,75 mm² Größe an willkürlich herausgegriffenen Stellen ausgezählt. Typische Formveränderungen wurden sowohl gezeichnet als auch photographiert.

Die Untersuchungen über den Einfluß der Hydratur erfolgte in feuchten Kammern aus Glasringen und Objektträgern, die mit einem Deckglas verschlossen waren, auf dessen Unterseite die Alge auf einem Gelatinetropfen (10%ige Gelatine, 0,08%ige Benecke-Lösung) geimpft war. In die Glasringe kamen zur Erzielung verschiedener Dampfspannung NaCl-Lösungen verschiedener Konzentration (Burcik, 1950). Nach H. Walter (1931, S. 163)[1] liegen dabei folgende Verhältnisse vor:

[1] Anmerkung: Berichtigung zu Burciks Tabelle nach H. Walter: H. Walter gibt nicht 7,0 g NaCl in 100 Teilen Wasser an bei einer relativen Dampfspannung von 95,4%, sondern 7,5 g NaCl in 100 Teilen Wasser. Dies wurde leider erst nach Beendigung der Versuche festgestellt, so daß auch bei uns dieser Fehler vorhanden ist.

Relative Dampfspannung .	100	99,0	98,2	97,4	96,5	95,4%
Atmosphären (abgerund.) .	0	14	25	35	46	59
g NaCl in 100 Teilen H_2O .	0,0	1,5	3,0	4,5	5,9	7,0
Spezifisches Gewicht . . .	1,00	1,01	1,02	1,03	1,04	1,05

Die Kammern standen bei 21° C in Dauerlicht von 2000 Lux und wurden täglich mikroskopiert.

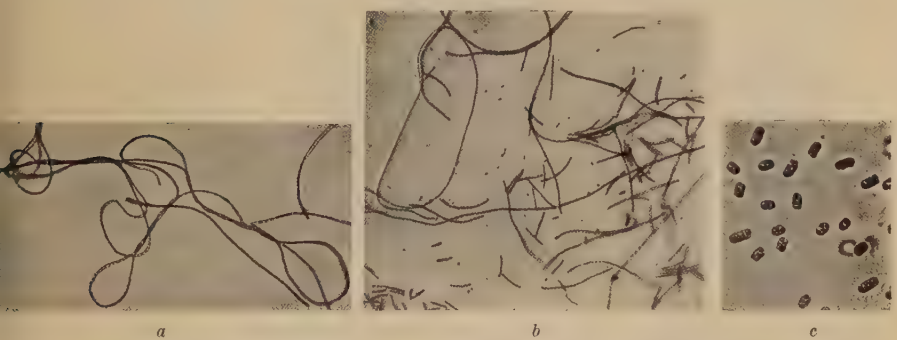
B. Ergebnisse.

1. Einfluß der Neutralsalze.

a) Untersuchungen an *Stichococcus bacillaris* Naeg. 379/*1b*.

α) Die normale Entwicklung einer Kultur.

Alle Versuchsergebnisse mit Salzen wurden mit der Entwicklung auf 0,008% iger Benecke-Lösung, die stets zur Kontrolle mitangesetzt wurde, verglichen. Die Entwicklung auf dieser Lösung sei als „normal" bezeichnet. In den ersten acht Tagen nach der Impfung bildeten sich Zellfäden von



a *b* *c*

Abb. 1. *Stichococcus bacillaris.* Zerfall der Algenfäden im September. *a* 8 Tage alte Kultur mit langen Fäden. Vergr. ~ 80fach. *b* 12 Tage alte Kultur mit Gemisch aller Fadenlängen. Vergr. ~ 80fach. *c* 16 Tage alte Kultur; Einzelzellen mit „Sphärulen". Vergr. ~ 330fach.

50 bis etwa 600 Zellen Länge. Dann setzte zunehmender Zerfall der Fäden ein (Abb. 1a—c); schließlich waren nur noch Einzelzellen vorhanden.

Die Kontrollen ergaben nicht immer gleiche Werte, wenn sie zu verschiedenen Jahreszeiten angesetzt wurden.

Deshalb mußten zu jeder Versuchsserie unbedingt immer Kontrollserien angesetzt werden, auf die die Salzkulturen bezogen werden konnten. Wenn also bei den nachstehend geschilderten Versuchsergebnissen die Vergleichskulturen ziemlich große Unterschiede zeigen, so beruht das auf derartigen Wirkungen. Für die Bewertung der Ergebnisse ist das ohne Bedeutung, weil die Kulturen stets den gleichen Bedingungen unterlagen wie die Kontrollen und die Ergebnisse nur auf diese bezogen wurden.

Das Wachstum war in den Normalkulturen stets stärker als in den Kulturen mit Salzzusatz und erreichte seinen Höhepunkt in den Monaten Mai—Juli.

Nach dem 16. Tage (nur in der Zeit vom Mai bis Juli wesentlich später) zeigten sich sogenannte „Sphärulen“ (Klercker, 1896) in den Zellen, tropfenförmige Stoffwechselprodukte von ölhaltiger Substanz, die besonders in den polar gelegenen Vacuolen auftraten. Sie nahmen bis zum 20. Tage ständig zu, traten aber nur in

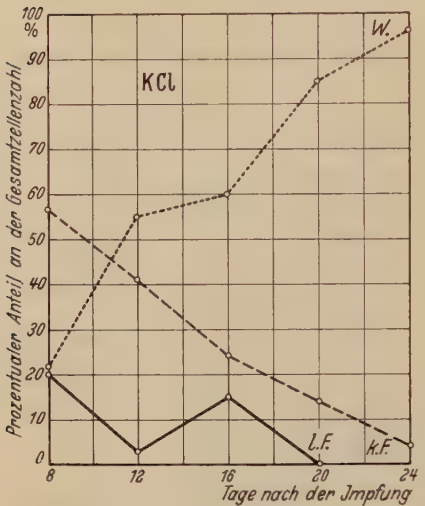


Abb. 2. Prozentualer Anteil der Wenigzeller (*W*), kurzen Fäden (*k. F.*) und langen Fäden (*l. F.*) an der Gesamtzellenzahl im Laufe der Entwicklung im April in einer 0,01 mol KCl-Kultur.

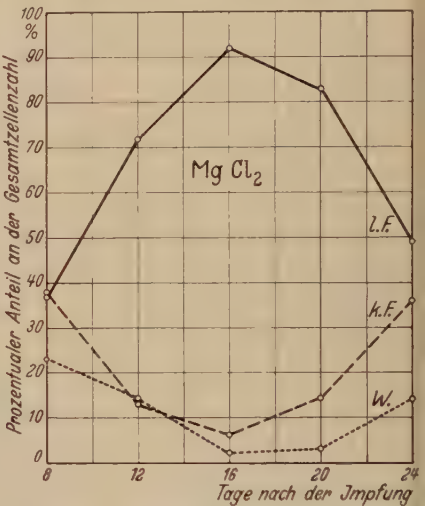


Abb. 3. Prozentualer Anteil der Wenigzeller (*W*), kurzen Fäden (*k. F.*) und langen Fäden (*l. F.*) an der Gesamtzellenzahl im Laufe der Entwicklung im April in einer 0,01 mol $MgCl_2$-Kultur.

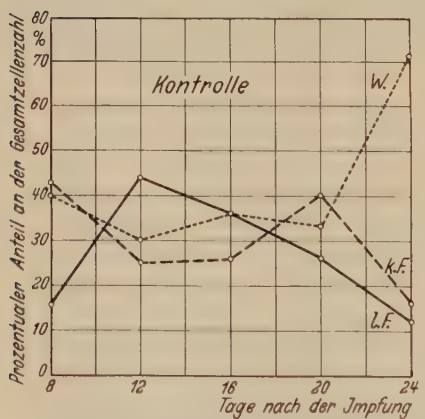


Abb. 4. Prozentualer Anteil der Wenigzeller (*W*), kurzen Fäden (*k. F.*) und langen Fäden (*l. F.*) an der Gesamtzellenzahl im Laufe der Entwicklung im April.

Einzelzellen auf und sind auf der Photographie (Abb. 1c), wenn auch nicht sehr deutlich, zu sehen.

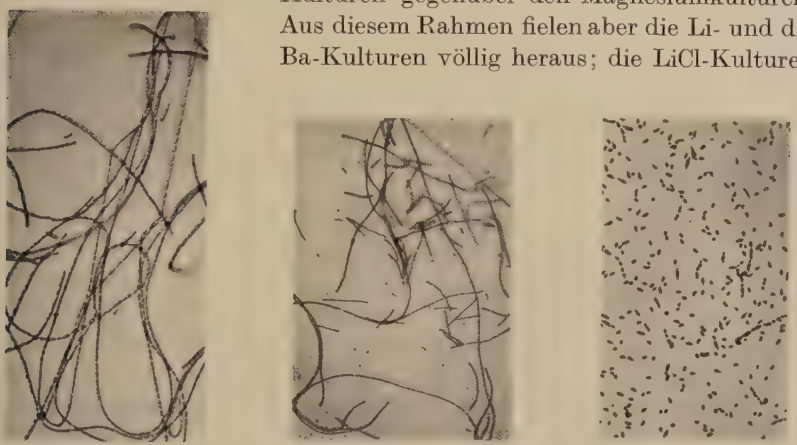
β) Entwicklung unter dem Einfluß von Neutralsalzen.

αα) Chloride verschiedener Kationen.

Der Zusatz eines Alkalichlorids begünstigte stets den Zerfall in Einzelzellen (vgl. Abb. 5*a*—*c*), der Zusatz eines Erdalkalichlorids verzögerte ihn dagegen. Das kommt am klarsten zum Ausdruck bei der Gegenüberstellung von KCl und $MgCl_2$. Während bei den Kaliumkulturen der Zerfall bereits am 8. Tage einsetzte (Abb. 2), begann er in den Magnesiumkulturen erst nach dem 20. Tage (Abb. 3). Die Kontrollen hielten sich in der Mitte, indem bei ihnen ein

zunächst schwacher Zerfall zwischen dem 12. und 20. Tage eintrat (Abb. 4). Entsprechend den jahreszeitlichen Schwankungen der Normalkulturen zeigten auch die Kulturen mit Salzzusatz Unterschiede im Laufe des Jahres; stets aber blieb die Beziehung erhalten, daß die Kaliumkulturen früher, die Magnesiumkulturen später als die Kontrollen in Einzelzellen zerfielen.

Ganz ähnlich, nur etwas abgeschwächt gegenüber den Kaliumkulturen verhielten sich die NaCl- und CsCl-Kulturen; auch in ihnen war der Zerfall der Fäden beschleunigt. Das gleiche gilt für die $CaCl_2$- und $SrCl_2$-Kulturen gegenüber den Magnesiumkulturen. Aus diesem Rahmen fielen aber die Li- und die Ba-Kulturen völlig heraus; die LiCl-Kulturen



a *b* *c*

Abb. 5. Aussehen verschiedener Kulturen am 12. Tag (September). *a* lange Fäden in 0,01 mo $MgCl_2$. Vergr. ~ 80fach. *b* Gemisch aller Fadenlängen in der Kontrolle. Vergr. ~ 80fach. *c* Einzelzellen in 0,01 mol KCl. Vergr. ~ 80fach.

verhielten sich wie Kulturen mit Erdalkalizusatz und verzögerten den Zerfall, während das $BaCl_2$ die Kulturen wie ein Alkalisalz beeinflußte und den Zerfall beschleunigte.

Die Reihe der Chloride mit zunehmender Zerfallswirkung auf die Algenfäden würde also lauten:

$$Mg < Ca < Sr < Li < \text{Kontrolle}, Ba < Cs, Na < K.$$

Mit Abnahme der Konzentration näherten sich alle Salze in ihrer Zerfallswirkung der Kontrollnährlösung. Auffallend war aber, daß in den niedrigsten Konzentrationen in allen Salzkulturen, auch in den Kalium- und Natriumkulturen, mehr Fäden gebildet wurden als in den Kontrollen. Nur die $BaCl_2$-Kulturen machten hier eine Ausnahme: mit Abnahme der Konzentration beschleunigten sie den Zerfall.

Die Wachstumsverhältnisse sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Neben Zellen der üblichen Größe traten in den Kulturen (besonders mit Alkalizusatz) verhältnismäßig häufig verlängerte Zellen auf, die

Tabelle 1. *Wachstum in den Chloridkulturen*[1].

— — — kein Wachstum, — — schlechtes Wachstum, — mäßiges Wachstum, + mäßig gutes Wachstum, + + gutes Wachstum, + + + sehr gutes Wachstum.

Salz	0,1 mol/Liter	0,01 mol/Liter	0,001 mol/Liter	0,0001 mol/Liter	0,00001 mol/Liter
LiCl	— — —	— —	+ +	+ + +	
NaCl	+	+ +	+ + +	+ + +	
KCl	+	+ + +	+ + +	+ + +	
CsCl			— — —	—	
$MgCl_2$	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	
$CaCl_2$	— —	+ + +	+ + +	+ + +	
$SrCl_2$	+ +	+ +	+ +	+ +	
$BaCl_2$	— — —	+	+ +	+ +	

Das Wachstum der Kontrollen war stets sehr gut (+ + +).

[1] In dieser und den folgenden Tabellen bedeutet das Fehlen eines Zeichens, daß die betreffende Konzentration nicht geprüft wurde.

vereinzelt bis zu 16 μ gegenüber der normalen Länge von 6—10 μ erreichten. Eine Ausnahme machten die Magnesiumkulturen, in denen statt längerer kürzere Zellen von 6 μ Länge gebildet wurden, während in den Kulturen mit 0,0001 mol CsCl-Zusatz eine Verbreiterung der Zellen eine durchschnittliche Zellgröße von 5 $\times$ 6 — 9 μ bewirkte. Dies war der einzige Fall, in dem im Laufe der Gesamtuntersuchungen eine Verbreiterung der *Stichococcus*-Zelle beobachtet werden konnte. Bemerkenswert waren auch die 0,001 mol LiCl-Kulturen, deren Fäden neben kurzen auch bis 23 μ lange Zellen enthielten, so daß ein ganz ungleichmäßiges Bild entstand; auch in Ba-Kulturen und in den sehr schlecht wachsenden 0,1 mol $CaCl_2$-Kulturen traten solche überlängerte Zellen bis 23 μ Länge auf. In allen anderen Erdalkalikulturen wurden nur Zellen normaler Größe gebildet.

Die gewöhnlich am 16. Tage zuerst auftretenden „*Sphärulen*" erschienen in Kulturen mit mäßigem oder schlechtem Wachstum bereits am 12. oder gar schon am 8. Tage als äußeres Zeichen gestörten Stoffwechsels (z. B. 0,01 mol LiCl, 0,1 mol NaCl, 0,0001 mol CsCl, 0,1 mol $CaCl_2$, 0,001 mol $BaCl_2$).

Auffallend war weiterhin die wechselnde Färbung der Chromatophoren. So trat in allen Kaliumkulturen bis zur Konzentration 0,01 mol ein im Verhältnis zu allen anderen Kulturen kleiner, scharf abgesetzter, tiefgrüner Chromatophor in den Zellen auf. In 0,001 mol LiCl-Kulturen waren die Chromatophoren häufig so blaß, daß sie nur undeutlich erkennbar waren. Das gleiche war der Fall in Cs-Kulturen der Konzentration 0,0001 mol/Liter.

$\beta\beta$) Einfluß der Sulfate verschiedener Kationen.

Zwischen Sulfaten und Chloriden waren nur geringe Unterschiede hinsichtlich des Einflusses auf den Zerfall der Zellfäden in Einzelzellen festzustellen. Wieder begünstigten die Alkalien den Zerfall und $MgSO_4$ ver-

zögerte ihn. Nur die Cs_2SO_4-Kulturen wichen ab; die Fäden zerfielen überhaupt nicht, sondern starben vor Beginn des Zerfalls ab.

Mit Verringerung der Konzentration näherten sich die Sulfatkulturen in ihrem Verhalten stets den Kontrollkulturen. Die Na- und K-Kulturen zeigten dabei immer einen beschleunigten Zerfall gegenüber den Kontrollen im Gegensatz zu dem Wachstumsablauf in den Chloridkulturen der entsprechenden Konzentrationen.

Tabelle 2. *Wachstum in den Sulfatkulturen.*

Salz[1]	0,1 mol/Liter	0,01 mol/Liter	0,001 mol/Liter	0,0001 mol/Liter	0,00001 mol/Liter
Li_2SO_4		— — —	+	+++	
Na_2SO_4	+	+++	+++		
K_2SO_4	+	+++	+++		
Cs_2SO_4				— — —	+
$MgSO_4$	+++	+++	+++		

[1] Die übrigen Erdalkalisulfate wurden wegen ihrer geringen Löslichkeit nicht untersucht.

Im Vergleich mit den Chloridkulturen (Tab. 1) fällt die etwas schlechtere Entwicklung der Li- und Cs-Kulturen auf (Tab. 2).

Hinsichtlich der Veränderung der Zellänge und der Chromatophorenfärbung sowie der Sphärulenbildung waren kaum Unterschiede zu den Chloridkulturen festzustellen. Nur in den Mg-Kulturen traten die kurzen Zellen von 6 μ Länge nicht nur vereinzelt sondern sehr gehäuft auf.

$\gamma\gamma$) Einfluß der Nitrate verschiedener Kationen.

Ganz anders als die Chlorid- und Sulfatkulturen verhielten sich die Nitratkulturen (Tab. 3). Sie enthielten durchweg mehr Fäden als die Kontrollkulturen und zerfielen entweder zur gleichen Zeit oder später

Tabelle 3. *Wachstum in den Nitratkulturen.*

	0,1 mol/Liter	0,01 mol/Liter	0,001 mol/Liter	0,0001 mol/Liter
$LiNO_3$		+	++	+++
$NaNO_3$	+	+++		
KNO_3	— — —	+++	+++	
$Mg(NO_3)_2$	+++	+++	+++	
$Ca(NO_3)_2$	+++	+++	+++	
$Sr(NO_3)_2$	— —	++	++	
$Ba(NO_3)_2$		— — —	— —	++

in Einzelzellen. Auch der Gegensatz zwischen Alkalien und Erdalkalien, wie wir ihn bei den Chloriden gefunden hatten, trat wesentlich weniger deutlich hervor.

Die Reihe zunehmender Zerfallswirkung der Nitrate lautet:

$$Ca < Sr, Mg, K < Na < Li < Ba < \text{Kontrolle}.$$

Die Unterschiede zwischen Kulturen verschiedener Konzentration eines Salzes waren im Verhältnis zu denen bei Chloriden und Sulfaten geringfügig. Gewöhnlich wurde mit abnehmender Konzentration der Zerfall beschleunigt.



Abb. 6. *Stichococcus bacillaris.* Gekrümmte Zelle. $NaNO_3$-Kultur. Vergr. ~ 700fach.

Das bei den Chloriden über Veränderung von Zellgröße und -inhalt Gesagte trifft auch für die Nitratkulturen zu. Ebenso wie dort trat in allen Kaliumkulturen der kleine, scharf abgesetzte, tief grüne Chromatophor auf, der die Fäden perlschnurartig erscheinen ließ.

Auffallend waren die in verschiedenen Nitratkulturen auftretenden gekrümmten Zellen. Sie wurden besonders in K-, Na, Ca- und Sr- (und noch stärker in Ammonium-)Kulturen beobachtet (Abb. 6).

δδ) Einfluß der Ammoniumsalze.

Die Ammoniumsalze verhielten sich bei guter Wachstumsförderung (Tab. 4) am interessantesten. Sie hatten durchweg die Tendenz, den Zerfall der Algen in Einzelzellen zu verhindern. Am vollständigsten gelang

Tabelle 4. *Wachstum in den Ammoniumkulturen.* Kontrolle +++

	NH_4Cl	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4NO_3
0,1 mol	+++	— — —	+++
0,01 mol	+++	+++	+++
0,001 mol	+++	+++	+++
0,0001 mol	+++	+++	+++

dies dem Nitrat. In den Konzentrationen 0,1, 0,01 und 0,001 mol/Liter traten Wenigzeller nur in ganz geringer Zahl auf (am meisten in 0,001 mol) und Einzelzellen selbst bei längster Versuchszeit überhaupt nicht (Abb. 7). Erst bei der sehr schwachen Konzentration von 0,0001 mol/Liter verhielten sich diese Kulturen ähnlich wie die Kontrollen (Abb. 8).

Ganz ähnlich verhielt sich das Ammoniumchlorid. Das Sulfat dagegen wirkte bei der höheren Konzentration von 0,1 mol/Liter so stark toxisch, daß jede Entwicklung unterdrückt wurde (Tab. 4).

Sehr auffällig waren die starken Krümmungen der Fäden in allen Ammoniumkulturen.

Nach 4 Tagen fand man kurze grade oder geschwungene Fäden mit einzelnen gekrümmten Zellen, die meist an den Enden der Fäden saßen (Abb. 9*a*). Am 8. Tage traten diese gekrümmten Zellen bereits gehäuft auf und saßen jetzt auch mitten in den nun sehr langen Fäden (*b*). Dabei traten die verschiedensten Formen auf.

Mehrere Zellen zusammen bildeten eine Schleife oder legten sich wie ein Hufeisen zusammen (*c*), andere bildeten nur einen Buckel innerhalb eines graden Fadens (*d*). Die gekrümmten Zellen waren meistens besonders lang (*e*). Allerdings traten überhaupt in allen Ammoniumkulturen besonders lange Zellen auf mit einem Maximum von 33 μ. Teilweise kam dies dadurch zustande, daß zwar die Chromatophoren sich schon geteilt hatten, Zellwände aber noch nicht gebildet worden waren, so daß bis zu 4 Chromatophoren in einer Zelle auftraten (*f*). Am 12. Tage bot sich ein neues Bild. Die langen Fäden hatten sich entweder zu dicken Seilen verschlungen

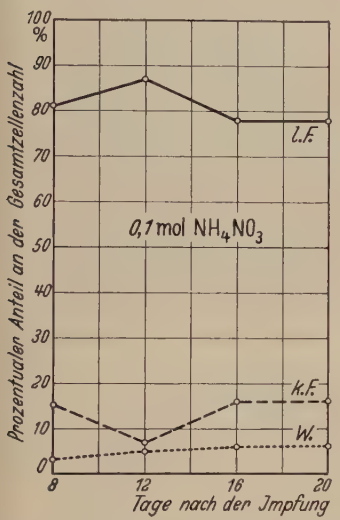


Abb. 7. Prozentualer Anteil der Wenigzeller (*W*, 1—4 Zellen), kurzen Fäden (*k. F.*, 5—20 Zellen) und langen Fäden (*l. F.*, > 20 Zellen) an der Gesamtzellenzahl im Laufe der Entwicklung im September in einer 0,1 mol NH_4NO_3-Kultur.

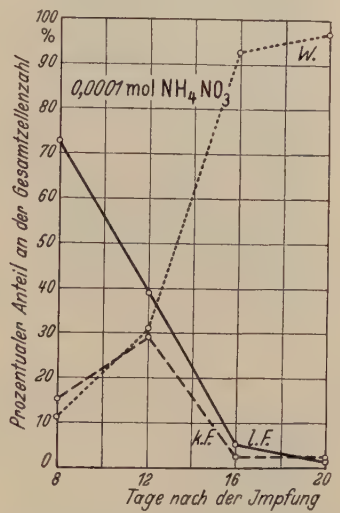


Abb. 8. Prozentualer Anteil der Wenigzeller (*W*), kurzen Fäden (*k. F.*) und langen Fäden (*l. F.*) an der Gesamtzellenzahl im Laufe der Entwicklung im September in einer 0,0001 mol NH_4NO_3-Kultur.

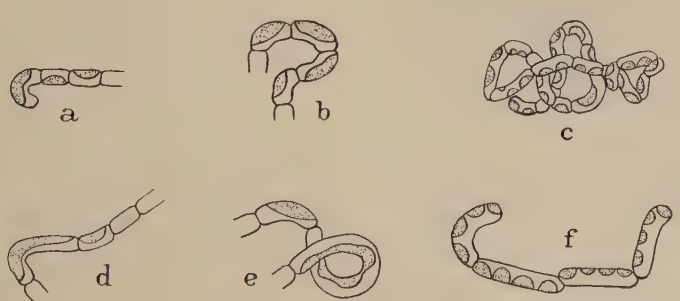


Abb. 9. *Stichococcus bacillaris.* Verschiedene Stadien der Zell- und Fadenkrümmung. *a* Gekrümmte Zellen am Ende der Fäden, 0,01 m ol NH_4NO_3-Kultur am 4. Tage. Vergr. ~ 700fach. *b* Gekrümmte Zellen in der Mitte der Fäden. 0,01 mol NH_4Cl-Kultur am 8. Tage. Vergr. ~ 900fach. *c* Hufeisen- und Schleifenbildung. 0,1 mol NH_4Cl-Kultur am 8. Tage. Vergr. ~ 550fach. *d* Lange gekrümmte Zellen. 0,1 mol NH_4Cl-Kultur am 8. Tage. Vergr. ~ 700fach. *e* Schleife aus einer langen Zelle. 0,1 mol NH_4Cl-Kultur am 12. Tage. Vergr. ~ 700fach. *f* Lange Zellen mit vier Chromatophoren. 0,01 mol $(NH_4)_2SO_4$-Kultur. Vergr. ~ 700fach.

(Abb. 10*a*), oder sie sahen wie geknickt aus (*b*). Man hatte den Eindruck eines beginnenden Zerfalls, der aber durch spätere Untersuchungen nicht bestätigt wurde. Vielmehr traten am 16. Tage regelrecht verknäuelte Fäden auf, die kaum noch als *Stichococcus* zu erkennen waren (*c*). Damit war der Höhepunkt erreicht. Mit dem Absterben lösten sich die Verschlingungen und die Fäden streckten sich ganz grade aus (*d*).

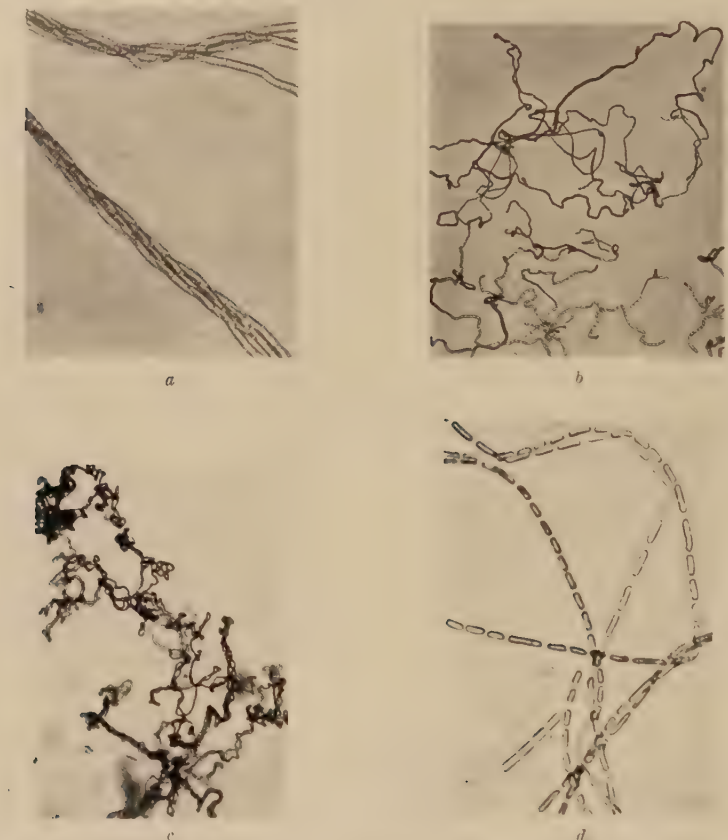


Abb. 10. *Stichococcus bacillaris*. Verschiedene Stadien der Zell- und Fadenkrümmung. *a* Zu Seilen verschlungene Fäden. 0,001 mol NH_4NO_3-Kultur am 12. Tage. Vergr. ~ 330fach. *b* Geknickte Fäden. 0,001 mol $(NH_4)_2SO_4$-Kultur am 12. Tage. Vergr. ~ 50fach. *c* Geknickte und geknäuelte Fäden. 0,001 mol $(NH_4)_2SO_4$-Kultur am 16. Tage. Vergr. ~ 80fach. *d* Abgestorbene wieder gerade gestreckte Fäden. 0,01 mol NH_4NO_3-Kultur am 16. Tage. Vergr. ~ 330fach.

Bemerkenswert waren die tiefdunkelgrünen Chromatophoren der Ammoniumkulturen. In allen anderen Kulturen waren sie wesentlich blasser.

Der Krümmungsgrad der Fäden nahm entsprechend der Fadenbildung mit der Konzentration ab. In den Kulturen mit einem Salzzusatz von 0,0001 mol waren nur vorübergehend einzelne gekrümmte Zellen zu

finden. Nur in ihnen traten auch „Sphärulen" auf, die bei stärkerer Konzentration der Salzzusätze schon deshalb fehlten, weil in ihnen keine Einzelzellen entstanden.

εε) Entwicklung der Algen unter dem Einfluß zweier Neutralsalze.

Wird die Wirkung zweier Neutralsalze in gemeinsamer Nährlösung untersucht, so kann entweder eine gleiche Wirkungsstärke beider Salze und damit eine Zwischenbildung gegenüber den Kulturen der Einzelsalze beobachtet werden, oder es kann die Wirkung des einen Salzes einseitig überwiegen. Die Nährlösungen mit $KCl + MgCl_2$ zeigen in ihrer Wirkung deutlich den ersten Fall. Der zweite Fall wird in Nährlösungen mit Zusatz von NH_4-Salzen verwirklicht.

Die Kaliumkulturen zeigten das bekannte Bild der stetigen Zunahme der Wenigzeller bis zum restlosen

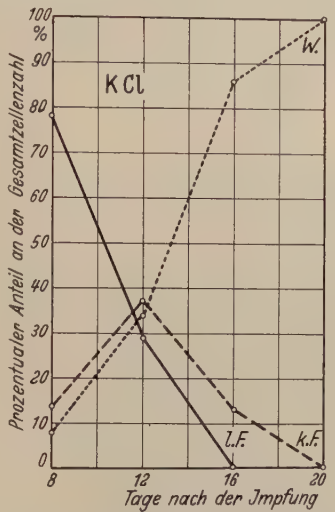


Abb. 11. Prozentualer Anteil der Wenigzeller (*W*), kurzen Fäden (*k. F.*) und langen Fäden (*l. F.*) an der Gesamtzellenzahl im Laufe der Entwicklung im September in einer 0,01 mol KCl-Kultur.

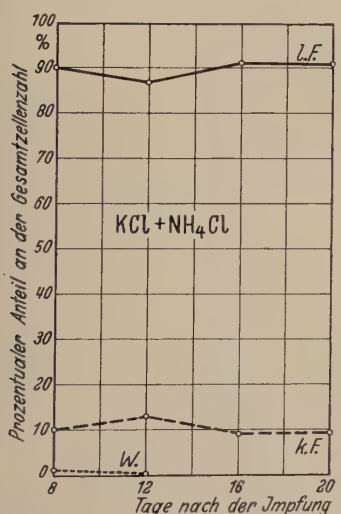


Abb. 12. Prozentualer Anteil der Wenigzeller (*W*), kurzen Fäden (*k. F.*) und langen Fäden (*l. F.*) an der Gesamtzellenzahl im Laufe der Entwicklung im September in einer Kultur mit 0,003 mol KCl + 0,007 mol NH_4Cl.

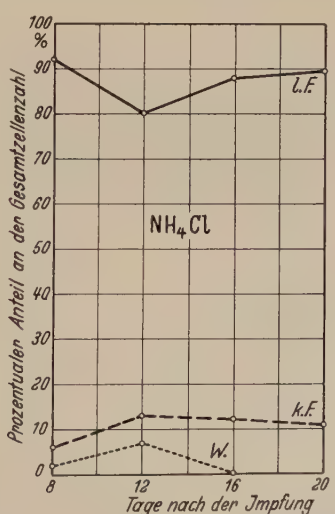


Abb. 13. Prozentualer Anteil der Wenigzeller (*W*), kurzen Fäden (*k. F.*) und langen Fäden (*l. F.*) an der Gesamtzellenzahl im Laufe der Entwicklung im September in einer 0,01 mol NH_4Cl-Kultur.

Untersuchte Kombinationen.

$KCl + MgCl_2$		$KCl + NH_4Cl$	
0,02	mol/Liter	0,01	mol/Liter
0,005 + 0,015	„	0,007 + 0,003	„
0,010 + 0,010	„	0,005 + 0,005	„
0,015 + 0,005	„	0,003 + 0,007	„
0,02	„	0,01	„

Zerfall in Einzelzellen (Abb. 11). Wurde NH_4Cl zugesetzt, so wurde diese Wirkung völlig verdeckt, ganz gleich in welchem Prozentsatz das Kaliumsalz ersetzt wurde. Schon 30% NH_4Cl genügten gegenüber 70% KCl, um die Fadenbildung zu erreichen. Die graphischen Darstellungen (Abb. 12 und 13) zeigen, wie gering der Unterschied zwischen einer mit KCl

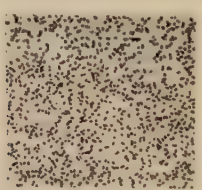


Abb. 14. *Stichococ us bacillaris.* 0,01 mol KCl-Kultur am 16. Tage. Vergr. ~ 40fach.

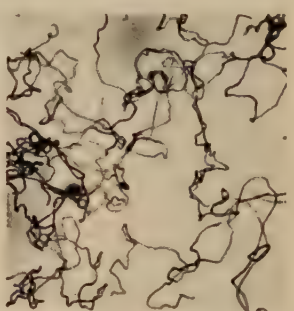


Abb. 15. *Stichococcus bacillaris* in Kultur mit 0,003 mol KCl + 0,007 mol NH_4Cl am 16. Tage. Vergr. ~ 50fach.

kombinierten und einer reinen NH_4Cl-Kultur war. Die Kulturen zeigten außerdem das typische Erscheinungsbild der Ammoniumkulturen, wie auf Abb. 14 im Gegensatz zu Abb. 15 zu sehen ist.

Dementsprechend setzte sich auch der starke Einfluß der Ammoniumsalze auf das Algenwachstum gegenüber $MgCl_2$ durch. Die langen Fäden

Untersuchte Kombinationen.

$MgCl_2 + NH_4Cl$		$KCl + KNO_3$	
0,01	mol/Liter	0,01	mol/Liter
0,007 + 0,003	„	0,007 + 0,003	„
0,005 + 0,005	„	0,005 + 0,005	„
0,003 + 0,007	„	0,003 + 0,007	„
0,01	„	0,01	„

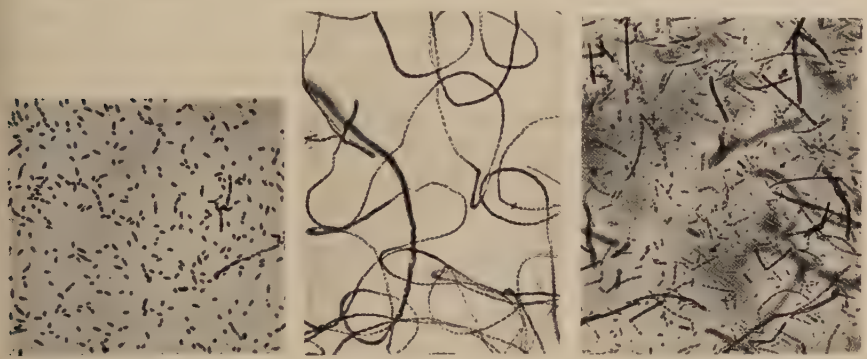
überwogen eindeutig und die Bildung von Wenig- und Einzelzellern unterblieb im Gegensatz zur reinen $MgCl_2$-Kultur. Mit Zusatz von NH_4Cl setzten auch sofort wieder die Verkrümmungen ein.

Die zerfallverhindernde Wirkung des Stickstoffs setzte sich auch dann durch, wenn man ihn in der Anionenform als Nitrat gab und in der

Mischung zweier Salze das gleiche Kation benutzte. Die Abb. 16*a*—*c* zeigen für den 12. Tag sowohl die starke Vereinzelung der Zellen in den reinen KCl-Kulturen (*a*) als auch die Erhaltung der langen Fäden in den Nitratkulturen (*b*) und die Mittelstellung zwischen beiden bei der Kombination beider Salze (*c*). Das Mischungsverhältnis von KCl zu KNO_3 spielte dabei keine entscheidende Rolle.

b) Untersuchungen an anderen Grünalgen.

Eine andere Rasse von *Stichococcus bacillaris*, die in Pringsheims Type-Culture-Collection of Algae als *Stichococcus bacillaris* Naeg. 379/*1a*



a *b* *c*

Abb. 16. *Stichococcus bacillaris* am 12. Kulturtag in Lösung von *a* 0,01 mol KCl, *b* 0,01 mol KNO_3, *c* 0,005 mol KCl + 0,005 mol KNO_3. Vergr. ~ 80fach.

geführt wird, verhielt sich hinsichtlich der Wirkung der Salze auf die Fadenbildung im Prinzip wie *Stichococcus 1b* (meine Hauptversuchsalge, bei Pringsheim als *Stichococcus bacillaris* Naeg. 379/*1b* geführt).

So trat bei ihr ebenfalls der Gegensatz zwischen der Wirkung der Alkali- und Erdalkalichloride hervor, wenn auch etwas schwächer als bei *Stichococcus 1b*. Die Fadenbildung war auch hier in den Erdalkalikulturen gefördert gegenüber den Alkalikulturen, in denen der Zerfall sehr früh einsetzte.

In Einzelheiten wich sie aber doch erheblich ab. So trat die stärkste Fadenbildung stets in der reinen Nährlösung der Kontrollen auf. Gekrümmte Zellen konnten nirgends beobachtet werden, und selbst in Ammoniumkulturen traten lediglich etwas verlängerte Zellen auf. Damit fiel auch die starke Fadenbildung fort, so daß NH_4Cl in dieser Hinsicht seinen Platz zwischen Alkali- und Erdalkalisalzen bekam. Wie bei *Stichococcus 1b* trat auch bei *Stichococcus 1a* in allen Zellen der Kaliumkulturen der kleine, scharf abgesetzte, tief grün gefärbte Chromatophor auf.

Aus versuchstechnischen Gründen war es nicht möglich, die nachstehend untersuchten Algenarten in ihrem Verhalten gegenüber der ganzen Reihe der Kationen und Anionen zu prüfen. Deshalb wurden die

Lösungen mit Zusatz von 0,01 mol KCl und 0,01 mol $MgCl_2$ als zwei gegensätzlich wirkenden Salzen für die Prüfung ausgewählt.

Stichococcus bacillaris aus Vischers Sammlung in Basel (Nr. 1), von der *Stichococcus bac. 1b* abstammen soll, reagierte überhaupt nicht auf die Salzzusätze. Er bildete in allen Kulturen ganz lange Fäden; erst am 15. Tage traten auch kurze Fäden und einige Wenigzeller auf, ohne jedoch in den Kaliumkulturen stärker zu überwiegen als in den $MgCl_2$-Kulturen. In den nächsten Tagen zerfielen alle Kulturen zunehmend in Einzelzellen.

Das umgekehrte war bei *Stichococcus mirabilis* Lagerh. 379/*3* (ebenfalls von Pringsheim) der Fall: in allen Kulturen überwogen die Ein- und Zweizeller. Fäden aus mehr als fünf Zellen traten gar nicht auf.

Hormidium nitens (335/*3* in Pringsheims Sammlung) verhielt sich ganz ähnlich wie *Stichococcus bacillaris 1a*. In den KCl-Kulturen waren bereits am 7. Tage nur noch Ein- und Zweizeller vorhanden, während in den $MgCl_2$-Kulturen die Fäden stark überwogen. Allerdings trat auch hier bald der Zerfall ein, so daß am 15. Tage in allen Kulturen nur noch Einzelzellen vorhanden waren (Tab. 5).

Tabelle 5. *Fadenbildung von Hormidium nitens am 7. Tage.*

	Einzeller	2-Zeller	3—4	5—10	10—50 Zellen
KCl	93,0%	7,0%	—	—	—
$MgCl_2$	25,7%	19,8%	6,9%	15,8%	31,6%

Ähnliche Reaktion zeigte *Hormidium flaccidum* A. Br. (335/*2a* von Pringsheim). Aber die Erscheinungsweise war doch recht verschieden. Nach dem Beimpfen bildeten alle Kulturen nur Fäden, die in den Lösungen mit Zusatz von $MgCl_2$ länger waren als in den KCl-Kulturen. Der Unterschied wurde aber immer größer, so daß am 29. Tage in den Kaliumkulturen neben kurzen und langen Fäden auch Einzelzellen vorhanden waren, während sich in den Magnesiumkulturen nur dichte Knäuel langer Fäden bildeten.

Am schwächsten reagierte *Hormidium barlowii* Pringsheim 335/*1a*. In allen Kulturen herrschten die langen Fäden vor. Erst am 29. Tage machte sich der Einfluß des KCl-Zusatzes durch Bildung kürzerer Fäden bemerkbar, während in den Magnesiumkulturen die langen Fäden auch dann noch erhalten blieben.

Stärker wichen die *Coelastrum*-Arten in ihrem Verhalten ab. *Coelastrum microporum* Naeg. (217/*1a* von Pringsheim) bildete in allen Kulturen ohne Unterschied überwiegend Kolonien aus, während *Coelastrum proboscideum* Bohlin var. *gracile* Vischer (217/*3* von Pringsheim) immer nur Einzelzellen entwickelte.

Dagegen zeigte *Coelastrum prob.* Bohlin var. *dilatatum* Vischer (217/*2* Pringsheims) gewisse Anklänge an das Verhalten von *Stichococcus*. In

den Mg-Kulturen überwogen stets die Kolonien, während in den Kaliumkulturen zunächst hauptsächlich isolierte Zellen auftraten. Am 29. Tage hatten sich jedoch auch hier neben Einzelzellen zur Hälfte Kolonien gebildet, die oft recht unregelmäßig aussahen.

Sehr einheitlich verhielten sich die *Scenedesmus*-Arten. *Scenedesmus basiliense* Vischer (276/*1a* Pringsheims) wies in den verschiedenen Lösungen einheitlich überwiegend isolierte Zellen neben einer begrenzten Zahl von Kolonien auf. *Scenedesmus Naegelii* Chodat (276/*2* Pringsheims) sowie *Scenedesmus quadricauda* Turpin em. Chodat (276/*4c* Pringsheims) bildeten dagegen überwiegend Kolonien aus vier Zellen unabhängig von der Art der verwendeten Lösung.

Eine nicht sicher bestimmte *Scenedesmus*-Art (wahrscheinlich *acutus*) aus Göttingen wurde auch noch bei verschiedener Konzentration sowohl der Nährlösung als auch der Salzzusätze kultiviert. Die Wuchsbeobachtungen bei verschiedener Nährlösungskonzentration sind in Tab. 6 wiedergegeben.

Tabelle 6.

Entwicklung von Scenedesmus spec. in verschiedenen Nährlösungskonzentrationen.

Benecke-Lösung	Wachstum	Form	Verband
0,0016—0,004%	— —	12—14 μ statt 8 μ breit	überwieg. Kolon.
0,008 —0,027%	+ + +	etwas breiter als normal	Kolonien
0,04 —0,08%	+ +	normal	Kolonien
0,16%	—	normal	überwieg. Kolon.
0,4%	— —	normal	mehr Kolonien als Einzelzellen
0,8%	— -	4—16 μ breit 8—32 μ lang Zellen jeder Größe und Gestalt	halb Kolonien, halb Einzelzellen

Auf ein ihr zusagendes Milieu reagierte die Alge also neben gutem Wachstum auch mit Koloniebildung, während unter- und oberhalb dieses Konzentrationsoptimums die Einzelzellen zunahmen, wie dies schon Grossmann (1912) beobachtete. Die weitere Prüfung erfolgte in 0,016%iger Nährlösung, die sich als am günstigsten erwiesen hatte; ihr wurden NaCl, KCl und LiCl in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (LiCl auch noch in Agarkulturen) (Tab. 7 und 8).

Man sieht, wie empfindlich die Art auf höhere Konzentrationen reagierte. Erst bei stärkerer Verdünnung der Lösung setzte die Koloniebildung ein. Bei den Konzentrationen, die eben noch vertragen wurden, traten die in der Literatur wiederholt beschriebenen verbreiterten bis kugeligen Zellen auf (Chodat 1909 und 1926, Grossmann 1912, Andreesen 1913). Auf Agar (Tab. 8) war die Giftigkeit von LiCl stark

Tabelle 7. *Entwicklung von Scenedesmus spec. bei Zusatz von KCl, NaCl und LiCl verschiedener Konzentration.*

	Konzentration	Wachstum	Verband
	Kontrolle:	+++	Kolonien
KCl	0,5 mol/Liter	— — —	—
	0,1 „	·	neben kugeligen Zellen auch normale Kolon. u. Einzelzellen
	0,05—0,001 mol/Lit.	++	überwiegend Kolonien
	0,0005—0,0001 „	+++	Kolonien
NaCl	0,5 mol	— — —	—
	0,1 „	— —	Einzelzellen, viele kugel. Zellen
	0,01 „	+	Einzelzellen
	0,001 „	++	überwiegend Kolonien
	0,0005 „	++	Kolonien
LiCl	0,5 —0,01 mol	— — —	—
	0,008 —0,004 „	—	Einzelzellen, kugelige Zellen
	0,002 —0,0008 „	++	halb Einzelzellen, halb Kolonien
	0,0006 „	++	überwiegend Kolonien
	0,0004—0,0001 „	++	Kolonien

Tabelle 8. *Entwicklung von Scenedesmus spec. bei Zusatz von LiCl verschiedener Konzentration auf Agar.*

LiCl-Konzentration	Wachstum	Verband
0,5 mol	— — —	—
0,1 „	— —	kugelige Einzelzellen
0,01 „	—	überwiegend kugel. Einzelzellen
0,008 —0,006 mol	+	halb Einzelzellen, halb Kolonien
0,004 —0,0008 „	++	halb Einzelzellen, halb Kolonien
0,0006—0,0001 „	++	überwiegend Kolonien

herabgesetzt; schon bei 0,1 mol/Liter zeigte sich in den Agarkulturen schwache Entwicklung, die in flüssigem Milieu erst bei 0,008 mol/Liter einsetzte. So deutlich die Konzentrationsunterschiede in ihrer Wirkung hervortraten, so wenig unterschieden sich die Reaktionen der Alge auf die drei untersuchten Alkalien.

Eine zweite Art, *Scenedesmus obliquus*, zeigte bei entsprechenden Untersuchungen ganz die gleichen Erscheinungen.

2. Einfluß der Hydraturänderung auf verschiedene Grünalgen.

Die starke Reaktionsfähigkeit von *Stichococcus bacillaris 1b* gegenüber verschiedenen Salzen sowie vor allem seine Empfindlichkeit gegen

zu hohe Konzentrationen der Salzlösungen ließ erwarten, daß er auch auf einen Wechsel der Hydraturverhältnisse mehr oder weniger ansprechen würde. Tatsächlich traten in den feuchten Kammern mit der verschiedenen Dampfspannung auch Verschiedenheiten auf.

Über Aqua bidest. entwickelten sich in fünf Tagen bis 16zellige gesunde Fäden, die in den folgenden fünf Tagen wieder in Einzelzellen zerfielen. Auffallend war dabei die Zusammenlagerung der Zellen (Abb. 17*a*). — Auch über 1,5% NaCl (99% relative Dampfspannung) bildeten sich in sieben Tagen noch gesunde Fäden, die teilweise aus mehr als 16 Zellen bestanden. Sie zerfielen aber in den drei folgenden Tagen sehr schnell in Einzelzellen (Abb. 17*b*). Die durchschnittliche Länge der Zellen lag an der oberen Grenze des Normalen und betrug 10—12 μ. — Über 3%iger NaCl-Lösung(Dampfspannung 98,2%) entwickelten sich nur noch 8zellige Fäden, die bereits in den ersten fünf Tagen „Sphärulen" bildeten. Die Länge der Zellen betrug ebenso wie über 1,5%iger NaCl-Lösung 10—12 μ. In den nächsten Tagen entstanden kleine Gruppen aus Einzelzellen, die sich langsam auflösten. Soweit noch zu kurzen Fäden verbundene Zellen vorhanden waren, streckten sie sich bis zu einer Länge von 16 μ. — Über der 4,5%igen NaCl-Lösung (97,4% relative Dampfspannung) machten sich erhebliche Wachstumshemmungen bemerkbar. Die Teilungsgeschwindigkeit ließ ganz erheblich nach. Während sonst täglich eine Teilung erfolgte, brauchten sie jetzt zwei Tage. Dadurch wurden die Zellen länger als normal (normal 6—10 μ). Am 5. Tage erreichten sie 16—20 μ Länge,

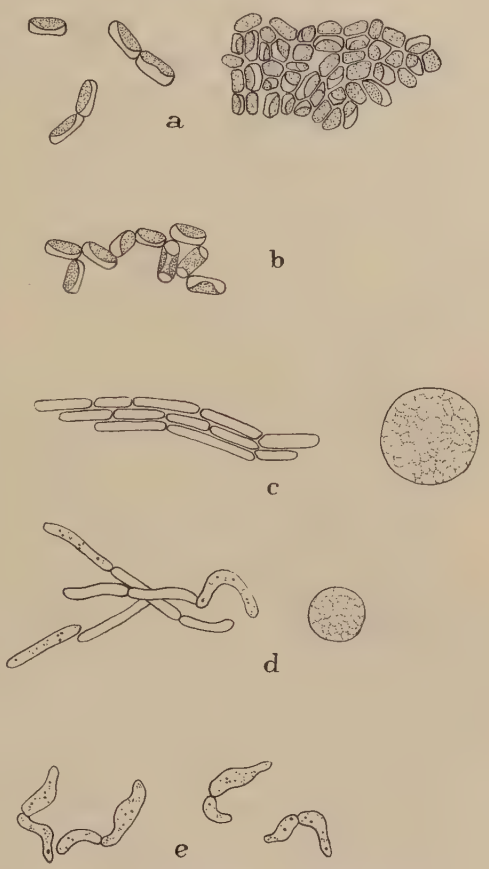


Abb. 17. Formveränderungen von *Stichococcus bacillaris 1b* unter dem Einfluß der Hydraturänderung. 9 Tage alte Kulturen über *a* Aqua bidest., *b* 1,5%iger, *c* 4,5%iger, *d* 5,9%iger, *e* 7%iger NaCl-Lösung. Vergr. ~ 700fach.

am 6. Tage gar 26—33 μ. Vom 8. Tage an entstanden ebenso wie über 3%iger NaCl-Lösung Zellhaufen, deren Einzelzellen sich auflösten (Abb. 17 *c*). Wo noch Fäden aus langen Zellen erhalten geblieben waren, war ihr Chromatophor nicht mehr zu sehen. Sie erschienen daher blaß, leer oder mit „Sphärulen" angefüllt (Abb. 17 *c*). — Über 5,9%iger NaCl-Lösung (96,5% relative Dampfspannung) war schließlich das Wachstum noch weiterhin verlangsamt. So bildeten sich nur noch Vierzeller, deren Zellen am 4. Tage bis 20 μ, am 9. Tage bis 30 μ Länge erreichten. Aber bereits vom 4. Tage an begannen sie zu verkrüppeln (Abb. 17 *d*) und am 8. Tage erschienen sich auflösende Zellhaufen. —Über 7,0% NaCl (95,4% relative Dampfspannung) fand kaum noch eine Entwicklung statt. Vom

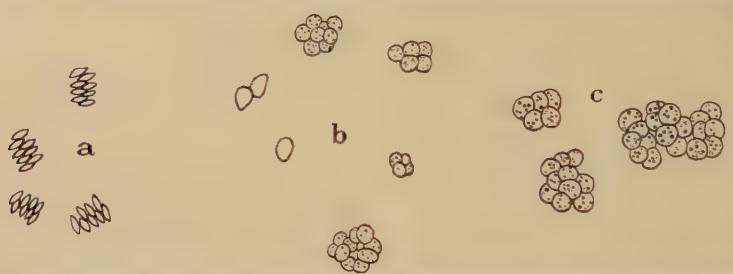


Abb. 18. Formveränderungen von *Scenedesmus* spec. unter dem Einfluß der Hydraturänderung. 6 Tage alte Kulturen über *a* Aqua bidest., *b* 1,5%iger NaCl-Lösung, *c* 3%iger NaCl-Lösung. Vergr. ~ 100fach.

4. Tage an verkrüppelten die wenigen Ein- und Zweizeller, erschienen wie aufgeblasen und wurden blaß und körnig (Abb. 17 *e*).

Stichococcus bac. Naeg. 379/*1a* erwies sich gegenüber erschwerten Hydraturverhältnissen als widerstandsfähiger. Während die Erscheinungen des Wachstums im ganzen die gleichen waren, traten die Besonderheiten erschwerten und geschädigten Wachstums doch immer erst in der nächst höheren Konzentrationsstufe gegenüber *Stichococcus bac. 1b* auf. Dabei wurden die Zellen höchstens doppelt so lang als normal. Auch die Ausbildung sich auflösender Zellhaufen blieb aus. Dafür traten verkümmerte Einzelzellen mit rotem Inhalt auf, die sich auflösten.

Als wesentlich empfindlicher erwies sich eine *Scenedesmus*-Art. Sie entwickelte nur über Aqua bidest. gesunde Kolonien und Einzelzellen in der Größe von $3 \times 10 \mu$ (Abb. 18*a*). Schon über 1,5%iger NaCl-Lösung bildeten sich bis zum 5. Tage Haufen dicker, runder Zellen von der Größe $13 \times 13 \mu$ mit körnigem Inhalt, wie sie Abb. 18*b* wiedergibt. — Bei Erhöhung der Konzentration der Salzlösung auf 3% änderte sich nur die Größe der Zellen, deren Durchmesser zwar nicht wesentlich, aber doch deutlich zunahm (Abb. 18 *c*). — Aber schon bei der nächst höheren Konzentration von 4,5% NaCl war bei einer relativen Dampfspannung von 97,4% die Grenze der Entwicklungsmöglichkeit erreicht. Die Algen vermehrten sich

nicht mehr. Die geimpften Kolonien wurden körnig; oft trat ein roter Tropfen in den Zellen auf, und schließlich lösten sich die Zellen auf. — Über stärkeren Lösungen waren nur noch undeutlich kleine, schmale, blasse Zellen zu erkennen, die manchmal mit roten Tropfen angefüllt waren.

Auch eine *Chlorella*-Art, die als letzte untersucht wurde, reagierte auf erschwerte Hydraturverhältnisse recht empfindlich. Normalerweise bildete sie 3 × 3 μ bis 5 × 5 μ große Zellen. Erst über einer 3%igen NaCl-Lösung vergrößerten sich die Zellen bis zu 7 × 7 μ, wiesen aber teilweise schon rote Tropfen im Inneren auf und lagen in Haufen zusammen. Über 5,9%iger NaCl-Lösung wurden Decken roter gegeneinander abgeplatteter Zellen von normaler Größe beobachtet, die in gleicher Weise bei der geringsten relativen Dampfspannung von 95,4% über einer 7,0%igen NaCl-Lösung auftraten, dort aber von Tag zu Tag kleiner wurden.

Die Vergrößerung, besonders Verlängerung von Zellen bei Abnahme der relativen Dampfspannung hat schon Burcik (1950) bei Bakterien beobachtet. Es scheint sich um eine Teilungshemmung infolge schlechter Lebensbedingungen zu handeln. Mit Grünalgen sind meines Wissens erst sehr wenig Untersuchungen über Hydraturänderungen gemacht worden (Walter, 1931). Diese wenigen Arbeiten beschränken sich außerdem meist auf die Feststellung des Hydraturminimums (also derjenigen Dampfspannung, bei der ein Wachstum gerade noch mikroskopisch feststellbar ist). Verständlicherweise gehören alle Algen, die bisher untersucht wurden, einschließlich der vorstehend beschriebenen zu den hygrophilen Organismen mit einem Hydraturminimum über 95% im Gegensatz zu den xerophilen und mesophilen, deren Hydraturminimum zwischen 85% und 95% liegt.

II. Besprechung.

Der Versuch einer Deutung unserer Befunde muß zweifellos von der Wirkung der untersuchten Salze auf den kolloiden Zustand der Zellmembran und des Plasmas ausgehen. Neben den Sorptionsvorgängen, die den osmotischen Druck in den Zellen beeinflussen, steht zu erwarten, daß vorwiegend Quellung und Entquellung eine maßgebende Rolle spielen. Zu diesem Ergebnis kommt die Mehrzahl der Autoren, die sich mit diesen Fragen befaßt haben (Hofmeister, 1888/89/90/91, Kotte, 1914, Lenk, 1916, Mac Dougal und Spoehr, 1917, Eisenberg, 1919, Spek, 1920, Kaho, 1921, 1926, Dokan, 1924, Port, 1925, Höber, 1926, Vischer, 1926, Boas, 1928, Gellhorn, 1929, Pirschle, 1930, 1932, Heinzel, 1948, Voss, 1952). Vor allem dürfte für den Zerfall der Algenfäden die mehr oder weniger starke Quellung der äußeren Schicht der Zellmembran wirksam werden. Würde der Quellungsvorgang allein entscheidend sein, so müßte für die Stärke des Zerfalls der Fäden im großen und ganzen die

Hofmeistersche lyotrope Ionenreihe zutreffen. Diese entspricht in der Tendenz, wenn auch nicht im einzelnen der Reihe steigender Permeabilität, die nach Kaho (1926) $Ca < Ba < Mg < Li < Na < K$ lautet. Es liegen aber genug Beobachtungen vor, die zeigen, daß sie nicht streng für alle Zellen verschiedener Arten gilt, weil es sich dabei nicht um einen rein physikalisch-chemischen, sondern einen physiologischen Vorgang handelt. So werden wir von vornherein keine restlose Übereinstimmung unserer gefundenen Reihen mit denen anderer Autoren erwarten können.

Mit geringen Abweichungen besonders jahreszeitlicher Art galt bei unseren Versuchen für die Chloride und untersuchten Sulfate die Kationenreihe:

$$NH_4 < Mg < Ca < Sr < Li < Ba < Cs, Na < K \longrightarrow$$

zunehmender Zerfall in Einzelzellen.

Für die Nitrate dagegen:

$$NH_4 < Ca < Sr, Mg, K < Na < Li < Ba\ .$$

In der Literatur findet man eine große Mannigfaltigkeit von Kationenreihen, die vielfach nur darin übereinstimmen, daß die entquellend wirkenden Erdalkalien am Anfang, die quellend wirkenden Alkalien am Ende der Reihe stehen. Gegenüberstellungen der verschiedenen Ionenreihen finden sich vor allem bei Eisenberg (1919), Kaho (1926), Boas (1928), und Gellhorn (1929). Vischer (1926) fand für die an *Stichococcus* untersuchten Chloride folgende Kationenreihe:

$$Ca < Mg, Na, K < Li < NH_4 \longrightarrow$$

mehr Einzelzellen.

Er gibt dazu an, daß nur in den Kontrollen und Ca-Kulturen Fäden auftraten, in allen anderen Kulturen Wenigzeller oder gar nur Einzelzellen. Dazu muß betont werden, daß er nur den Zustand an einem bestimmten Tage untersuchte, nicht aber die Entwicklung verfolgte; auch gibt er nicht den Monat an, obwohl auch er fand, daß die Jahreszeit einen erheblichen Einfluß hatte. Dadurch mögen die Unterschiede zwischen Vischer, und den eigenen Ergebnissen verständlich werden. Auffallend ist vor allen Dingen die Stellung von Mg und NH_4 im Gegensatz zu unseren Beobachtungen.

In der Literatur wird wiederholt darauf hingewiesen, daß die Konzentration der Salze einen bedeutenden Einfluß auf die Quellungswirkung hat (Lenk, 1916, Mac Dougal und Spoehr, 1917, Spek ,1920, Walter, 1923, Dokan, 1924, Boas, 1928, Brauner, 1930). Vergleichen wir nicht die höchstmöglichen, d. h. nicht mehr schädlich wirkenden Salzkonzentrationen, sondern isomolare Konzentrationen unter Fortlassung der in der entsprechenden Konzentration stark toxisch wirkenden Salze, so

ergibt sich für die Chloride und Sulfate bis zur Konzentration 0,01 mol die Reihe:

$$NH_4 < Ba, Ca, Mg, Sr < Na < K.$$

Für die Nitrate dagegen besteht nur bei der Konzentration 0,1 mol die Beziehung:

$$NH_4 < \text{Erdalkalien} < \text{Alkalien}$$
$$\longrightarrow$$
$$\text{zunehmender Zerfall.}$$

In niedrigeren Konzentrationen wird der Unterschied bedeutend schwächer, so daß die Aufstellung einer Reihe nicht mehr sinnvoll ist. Nur der starke Unterschied zwischen dem Ammoniumion und allen anderen Kationen bleibt bis zur Konzentration 0,001 mol bestehen.

Vergleicht man den Einfluß der niedrigeren Konzentrationen der Chloride und Sulfate (0,001 und 0,0001 mol), so sieht man auch hier, daß die Unterschiede mit fallender Konzentration geringer werden und der Zusammenhang zwischen Wertigkeit und Einzelzellenbildung sich verwischt. Auch die charakteristische Wirkung des Ammoniumions verschwindet bei der Konzentration 0,0001 mol.

Das Ammoniumion wird von den meisten Autoren (Kotte, 1914, Ruhland und Hoffmann, 1925, Brauner, 1930) an das Ende der Permeabilitätsreihe als stark quellendes und leicht permeierendes Ion gestellt. Um so auffälliger ist seine gerade entgegengesetzte Stellung in unseren Reihen. In der Literatur sind kaum Beobachtungen darüber vorhanden. Nur Vischer (1926) gibt an, daß das NH_4-Ion die Quellung stark verhindern soll, führt aber *Stichococcus bacillaris* gerade als Ausnahme an, da er in NH_4Cl-Kulturen nur Einzelzellen fand. Da sich die untersuchte Alge aber hinsichtlich der übrigen Salze durchaus anderen Objekten ähnlich verhält, bliebe nur die nicht sehr wahrscheinliche Annahme, daß die in Ammoniumkulturen beobachteten Verknäuelungen der Algenfäden als eine Art extremer Quellung aufzufassen sind und die Fadenbildung nur eine Folge davon ist. Dem Ammoniumion speziell für diesen Fall eine entquellende Wirkung zuzuschreiben, liegt an sich kein Anhalt vor. Andererseits darf nicht verkannt werden, daß NH_4 durch seine Wirkung als Nährstoff die Plasmabildung wesentlich fördert und damit die Zellen lange Zeit im teilungsfähigen Zustand erhält. Solange wird aber auch die Fadenbildung begünstigt.

Für eine quellende Wirkung des Ammoniumions spricht in unserem Falle, daß lange Zellen außer in NH_4-Kulturen bevorzugt in solchen Kulturen auftraten, die schnell in Einzelzellen zerfielen, wie die Alkalikulturen. Als Sondererscheinung fanden sie sich auch in den niedrigen Konzentrationen von $BaCl_2$, in denen ebenfalls die Einzelzellen sehr bald überwogen. Heinzel (1948) führt die Ausbildung langer Zellen bei Bakterien darauf zurück, daß die durch quellende Ionen bedingte erhöhte Kolloidhydratation, die ein abnorm starkes Eindringen der Salze in die Zelle zur Folge hat, die Teilung hemmt und so die Zelle vergrößert wird. In Ammonium-

kulturen ließ sich dies bei uns deutlich daran beobachten, daß zwar die Chromatophoren sich noch teilten, oft aber keine Zellwände gebildet wurden. Artari (1904, 1906) nahm an, daß hohe Konzentrationen an sich die Teilung hemmen und dadurch lange Zellen entstehen. In unserem Falle ist dann aber nicht einzusehen, warum etwa bei hohen Magnesiumkonzentrationen keine langen Zellen auftraten. Für die Calciumkulturen traf dies allerdings tatsächlich zu.

Auch gekrümmte Zellen finden sich vorwiegend in quellend wirkenden Lösungen. Immerhin ist die Erklärung dieser Erscheinung wesentlich schwieriger und wohl nicht allein auf Quellung oder Entquellung zurückzuführen. Zwar gibt z. B. Boas (1928) an, daß durch quellende Agentien Zelldeformationen hervorgerufen werden können; aber dabei handelt es sich meist um Abrundungen länglicher Zellen, also allseitig sich gleichmäßig auswirkende Quellung, soweit nicht durch Aufnahme stark osmotisch wirkender Salze eine Erhöhung des osmotischen Druckes des Zellsaftes eingetreten ist. Bei gekrümmten Zellen liegt aber eine aus unbekannten Gründen starke Bevorzugung einer Seite vor, ohne die eine Krümmung nicht stattfinden würde. Daß eine NH_3-Wirkung vorliegt, ist wenig wahrscheinlich, da eine p_H-Änderung nicht vorhanden ist. Auffallend ist die starke Rassenspezifität hinsichtlich der Reaktion auf Ammoniumsalzlösungen. Der so nahe verwandte und auf alle anderen Salze ähnlich reagierende *Stichococcus bacillaris 1a* zeigte auch nicht eine Spur von Krümmung in den NH_4-Salzlösungen. Für ihn ergab sich eine Stellung des NH_4-Ions zwischen Alkalien und Erdalkalien, was immerhin den Ergebnissen anderer Autoren nahe kommt. Auch Vischer (1926) gibt für *Stichococcus bacillaris* keinerlei Krümmungstendenz in NH_4-Kulturen an. Gernecks Beobachtung der Zellverbiegungen kurz vor dem Absterben der *Stichococcus*zellen fand in unseren Untersuchungen keine Bestätigung. Am besten stimmen unsere Beobachtungen mit denen von Klercker (1896) überein, der Krümmungen besonders an verlängerten Zellen beobachtete. Da sie zugleich bei Bildung langer Fäden und Behinderung des Zerfalls trotz starker Quellung auftraten, muß man sie wohl mit den dadurch gegebenen besonderen Wachstumsverhältnissen in Beziehung bringen.

Die von Gerneck (1907) beobachteten Zellverbiegungen scheinen dagegen anderer Art zu sein. Sie sind wohl eher den Involutionsformen vergleichbar, die wir in den Versuchen über die Hydratur bei relativ geringer Dampfspannung beobachteten. Dabei wird es sich also eher um eine Wasserentziehung als um eine Quellung handeln. Auch die Verlängerung der Zellen mit abnehmender Dampfspannung beruht hier zweifellos auf einer Teilungssistierung infolge schlechter Lebensbedingungen durch Entzug des Wassers.

Sie geht konform mit einer Wachstumshemmung, die bei den Versuchen in NH_4-Salzlösungen keineswegs auftrat. Das zeigt auch die folgende Kationenreihe zunehmender Wachstumshemmung:

$$Mg, NH_4 < K, Ca < Na < Sr < Ba < Li < Rb < Cs.$$

Man sieht, daß zwischen Permeabilität und Wachstumshemmung keine Parallele vorhanden ist, was auch Voss (1952) bei kokkoiden Bakterien feststellte. Dagegen beobachtete Kaho (1926), daß ein Salz entsprechend der Reihe: $Ca < Ba < Mg < Li < Na < K$ umso giftiger ist, je leichter es ins Plasma eindringt.

Kotte (1914), Eisenberg (1919) und Port (1925) fanden wenigstens eine gewisse Annäherung an diese Regel, Eisenberg bei Bakterien allerdings nur für die Anionen, während er für Kationen fast eine Umkehr der Regel feststellte: $Na < K < NH_4 <$

Li < Mg < Ca < Sr < Ba. Borowikow kam nach Kaho (1926) zu einer ähnlichen Reihe zunehmender Wachstumshemmung: NH_4 < K < Na < Li < Mg < Ba < Ca < Sr. Kaho (1926) führt dies darauf zurück, daß zweiwertige Ionen bei Wachstumsprozessen die Hydratation der jungen Zellwandkolloide unmittelbar herabsetzen, was zu einer Wachstumshemmung führt.

Für unsere Versuche ist die Diskussion dieser Verhältnisse deshalb nicht weiter fruchtbar zu machen, weil wir nicht mit reinen Salzlösungen arbeiteten, sondern die Salze nur einer sogenannten physiologisch äquilibrierten Lösung zusetzten. Es handelte sich also eigentlich um Versuche mit Elektrolytkombinationen, wenn auch ein Salz stets stark im Überschuß vorhanden war. Es ist aber eine lange bekannte Tatsache, daß besonders Salze verschiedener Valenz sich gegenseitig entgiften können. Speziell Calcium spielt dabei eine große Rolle, wenn es auch, wie in unserer Grundlösung, nur mit 0.0005 mol vertreten ist.

Am besten stimmt unsere Reihe mit den Ergebnissen von Pirschle (1930/32) überein, der Wachstumsmessungen an den Keimlingen höherer Pflanzen anstellte. Er ordnet die Ionen nach dem periodischen System und zeigt, daß die beiden Kationen K und Ca mit mittlerem Atomgewicht am günstigsten wirken. Dagegen verstärkt sich die Wachstumshemmung sowohl mit abnehmendem wie zunehmendem Atomgewicht.

$$\begin{array}{l} \mathrm{Li} > \mathrm{Na} > \mathrm{K} \ < \mathrm{Rb} < \mathrm{Cs} \\ \mathrm{Mg} > \mathrm{Ca} < \mathrm{Sr} \ < \mathrm{Ba}. \end{array}$$

Wenn man vom Magnesium absieht, lassen sich unsere Ergebnisse in das gleiche Schema einordnen. Voss (1952) bestätigt es für kokkoide Bakterien. Pirschles Ergebnisse stimmen auch insofern mit unseren Beobachtungen überein, als er in den Reihen jeweils bei den Ionen mit höherem Atomgewicht stärkere Wachstumshemmungen findet als im ersten Teil der Reihen. Er gibt an, daß die Verhältnisse besonders deutlich in Versuchen mit Nährlösungen zum Ausdruck kamen. Je mehr er seine Lösungen verdünnte, um so geringer wurden ebenso wie in unseren Versuchen die Unterschiede. Er nimmt an, daß es sich bei den gefundenen Reihen um ein Zusammenwirken zunehmender Ionenradien und abnehmender Hydratation handelt.

Die Wirkung der *Anionen* in unseren Versuchen ist verhältnismäßig schwach; die auftretenden Unterschiede sind schwächer als in der Kationenreihe. Auffallend ist immerhin die eindeutige Beziehung:

$$\underset{\text{stärkerer Zerfall.}}{\mathrm{NO_3} \ll \mathrm{SO_4},\ \mathrm{Cl} \longrightarrow}$$

Die Mehrzahl der vorgenannten Autoren gibt hingegen folgende Reihe steigender Quellung an: SO_4 < Cl < NO_3. Nur Vischer (1926) bestätigt für *Pseudendoclonium basiliense*, daß die Nitrate den Zusammenhalt der Zellen gegenüber Sulfaten und Chloriden förderten. Die von ihm als Beleg beigefügten Zeichnungen von Nitrat-, Chlorid- und Sulfatkulturen weisen allerdings nur recht geringe Unterschiede auf.

Unsere Versuche machen es wahrscheinlich, daß es sich bei der Nitratwirkung gar nicht um einen Quellungseffekt, sondern lediglich um einen

Ernährungs- also Wachstumseffekt handelt; sie deckt sich auch mit der NH_4-Wirkung. Das Wachstum in den Nitratkulturen war gegenüber Chlorid- und Sulfatkulturen etwa doppelt so stark. Eine Beziehung zur lyotropen Reihe der Anionen ist daher aus unseren Versuchen nicht zu entnehmen. Schon eher sind unsere Ergebnisse vergleichbar mit Wischmanns Anionenreihe steigender Giftwirkung auf *Spirogyra* (nach Kotte, 1914): $NO_3 < Cl < SO_4$.

Zusammenfassung.

1. Die Alge *Stichococcus bacillaris* bildet im Laufe ihrer Entwicklung normalerweise nacheinander Wenigzeller — kurze Fäden — lange Fäden — kurze Fäden und Wenigzeller — Einzelzellen.

2. Neutralsalze hatten teilweise einen erheblichen Einfluß auf die Entwicklung:

A. Die Alkalichloride und -sulfate (außer Lithium) beschleunigten die Einzelzellenbildung bzw. den Zerfall.

B. Alle untersuchten Erdalkalichloride (außer Barium) und -sulfate sowie sämtliche Nitrate begünstigten hingegen die Fadenbildung bzw. verzögerten den Zerfall.

C. Alle Ammoniumsalze verhinderten den Zerfall vollkommen.

3. Mit Verminderung der Konzentration wurde auch die Wirkung des Salzes abgeschwächt.

4. Die Breite der Algenzellen war sehr konstant. Nur die Länge nahm in einigen Salzkulturen teils bei verlangsamtem Wachstum, teils als spezifische Wirkung eines Salzes zu.

5. Die Form der Alge veränderte sich entscheidend in allen Ammoniumkulturen. Es traten stärkste Krümmungen der Zellen und Fäden auf.

6. Vereinzelt traten Zellkrümmungen auch in Nitratkulturen auf.

7. Bei Kombination von KCl und NH_4Cl sowie $MgCl_2$ und NH_4Cl wurde die Wirkung des Alkali- bzw. Erdalkalisalzes weitgehend von der des Ammoniumsalzes überdeckt.

8. Bei Kombination von Chlorid und Nitrat sowie Alkali- und Erdalkalisalz wurde die Wirkung der Einzelsalze abgeschwächt.

9. Bei der Untersuchung anderer Grünalgen ergab sich, daß sie sich gegenüber Alkali- und Erdalkalisalzen entweder wie *Stichococcus bacillaris* verhielten oder gar nicht auf Salzzusätze reagierten.

Scenedesmus bildete bei Nährlösungs- oder Salzkonzentrationssteigerung isolierte Zellen, teilweise von kugeliger Gestalt, bei Senkung der Konzentration dagegen Kolonien.

10. Durch Änderung der Hydratur konnten erhebliche Formveränderungen erzielt werden.

11. Die Jahreszeit scheint auch einen gewissen Einfluß auf die fädige Ausbildung bei *Stichococcus bacillaris* auszuüben.

Herrn Professor Dr. Harder danke ich für seine Anregungen und stets hilfsbereite Leitung. Ebenfalls großen Dank schulde ich dem Assistenten des Pflanzenphysiologischen Instituts, Herrn Dr. Koch, für seine tatkräftige Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft.

Literatur.

Abderhalden: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. XII. 1924. — Andreesen: Beitrag zur Physiologie von Scenedesmus acutus Meyer. Diss. Kiel 1913. — Artari: Der Einfluß der Konzentrationen der Nährlösungen auf die Entwicklung einiger grüner Algen. Jb. wiss. Bot. **40**, 593 (1904); **43**, 177 (1906).

Benecke: Über Kulturbedingungen einiger Algen. Bot. Ztg. **56**, 83 (1898). — Beyerinck: Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. Bot. Ztg. **48**, 725 (1890; Bericht über meine Kulturen niederer Algen auf Nährgelatine. Zbl. Bakter. **13**, 368 (1893). — Boas: Die Pflanze als kolloidales System. Freising, 1928. — Brand: Berichtigungen bezüglich der Algengruppen Stichococcus Naeg. und Hormidium Kütz. Ber. dtsch. bot. Ges. **31**, 64 (1913). — Brauner: Untersuchungen über die Elektrolyt-Permeabilität und Quellung einer leblosen natürlichen Membran. Jb. Bot. **73**, 513 (1930). — Burcik: Über die Beziehungen zwischen Hydratur und Wachstum bei Bakterien und Hefen. Arch. Mikrobiol. **15**, 203 (1950).

Chodat: Le polymorphisme des Algues. Mémoires publ. à l'Occasion du Jubilé de l'Univ. de Genève. Nr. **3**, (1909); Monographie du genre Scenedesmus. Rev. d'Hydrobiologie **3**. Aarau (1926).

Dokan: Die Wirkung der Elektrolyte auf die Quellung des Agars. Kolloid-Z. **34**, 155 (1924). — Dusi: Culture bactériologiquement pure et nutrition autotrophe d'Eudorina elegans Ehrbg. (Volvocidées). Rôle du fer pour la formation des colonies. Ann. Inst. Pasteur **64**, 340 (1940).

Eilers: Zur Kenntnis der Ernährungsphysiologie von Stichococcus bacillaris Naeg. Rec. Trav. bot. néerl. **23**, 362 (1927). — Eisenberg: Über den Zusammenhang zwischen Hemmungswirkung und Konstitution anorg. Salze. Zbl. Bakter. I. **82**, 69 (1919).

Famintzin: Die anorganischen Salze als ausgezeichnetes Hilfsmittel zum Studium der Entwicklungsgeschichte der niederen Pflanzenformen. Mêmoires Acad. imp. des Sc. de St. Petersbourg (1872). — Fitting: Untersuchungen über die Aufnahme von Salzen in die lebende Zelle. Jb. wiss. Bot. **56**, 1 (1915). — Freund: Die Abhängigkeit der Zelldimensionen von Außenbedingungen. Ber. dtsch. bot. Ges. **41**, 245 (1923). — Freundlich: Über das Ausfällen kolloidaler Lösungen durch Elektrolyte. Z. physik. Chem. **44**, 129 (1903).

Gellhorn: Das Permeabilitätsproblem. Berlin: Springer 1929. — Gerneck: Zur Kenntnis der niederen Chlorophyceen. Beih. Bot. Zbl. II. **21**, 221 (1907). — Gistl: Zur Kenntnis der Erdalgen. Arch. Mikrobiol. **3**, 634 (1932). — Grossmann: Zellvermehrung und Koloniebildung bei einigen Scenedesmaceen. Internat. Rev. d. Hydrobiol. **9**, (1912).

Hartmann: Über die Veränderungen der Koloniebildung von Eudorina elegans und Gonium pectorale unter dem Einfluß äußerer Bedingungen. Arch. Protistenkde. **49**, 375 (1924). — Heering: Paschers Süßwasserflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz VI. Jena, 1914. — Heinzel: Experimentelle Untersuchungen zur Ausbildung von Faden- und Kettenformen bei Bacterium prodigiosum. Arch. f. Mikrobiol. 1948. — Höber: Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe. Leipzig 1926. — Hofmeister: Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Arch. f. exper. Path. **24**, 247 (1888); **25**, 1 (1889); **27**, 395 (1890); **28**, 210 (1891).

Issatschenko: Über Pleomorphismus bei Stichococcus bac. Scripta botanica **29**, Petrograd (1911).

Kaho: Beitrag zur Permeabilität des Pflanzenplasmas für Neutralsalze. Biochem. Z. **123**, 284 (1921); Das Verhalten der Pflanzenzelle gegen Salze. Erg. Biol. **1**, 380 (1926). — Klebs: Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Jena, 1896. — Klercker: Über zwei Wasserformen von Stichococcus. Flora (Jena) **82**, 90 (1896). — Kotte: Turgor und Membranquellung bei Meeresalgen. Wiss. Meeresuntersuchungen. N. F. **17**, Kiel (1914).

Lefèvre, Jacob et Nisbet: Auto- et hétéroantagonisme chez les algues d'eau douce. Ann. Station Centrale d'Hydrobiologie appliquée. **4**, 5 (1952). — Lenk: Bedeutung der Elektrolyte für Quellungsprozesse. Biochem. Z. **73**, 15 (1916). — Lewith: Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Arch. exper. Pathol. u. Pharmakol. **24**, 1 (1888). — Livingston: On the nature of the stimulus which causes the change of form in polymorphic green algae. Bot. Gaz. **30**, 289 (1900); Further notes on the physiology of polymorphism in green algae. Bot. Gaz. **32**, 292 (1901); Chemical stimulation of a green Algae. Bull. Torrey Bot. Club **32**, 1 (1905).

Mac Dougal and Spoehr: The effects of acids and salts on biocolloids. Science (Lancaster, Pa.) n. sér. **46**, (1917, 14. Sept.). — Migula: Über den Einfluß stark verdünnter Säuren. Diss. Breslau 1888.

Naegeli: Gattungen einzelliger Algen. Zürich 1849. — Neuschloss: Die kolloidchemische Bedeutung des physiologischen Ionenantagonismus und der äquilibrierten Salzlösungen. Arch. f. Physiol. **181**, 17 (1920).

Oltmanns: Morphologie und Biologie der Algen. III. Jena 1923, 2. Aufl. — Osterhout: Extreme Toxicity of Sodium Chloride and its Prevention by other salts. J. of Biol. Chem. **1**, 363 (1905).

Pirschle: Untersuchungen über die physiologische Wirkung homologer Ionenreihen. Jb. Bot. **72**, 335 (1930); **76**, 1 (1932). — Pratt: Studies on Chlorella vulgaris. Amer. J. Bot. **27**, 52 (1940). — Port: Über Wirkung der Neutralsalze auf Durchdringung der H- und OH-Ionen durch das Pflanzenplasma. Biochem. Z. **166**, 105 (1925). — Pringsheim: Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen I. Mittl: Die Kultur von Algen in Agar. Beitr. Biol. Pflanz. **14**, 283 (1926).

Rayss: Le Coelastrum proboscideum Bohl. Etude de planctologie expérimentale suivie d'une révision des Coelastrum de la Suisse. Matériaux pour la flore cryptogamique suisse. **5** (1915). — Richter, A.: Über die Anpassung der Süßwasseralgen an Kochsalzlösungen. Flora (Jena) **75**, 4 (1892). — Richter, O.: Die Ernährung der Algen. Monogr. u. Abh. zur internat. Revue d. ges. Hydrobiol. u. Hydrogr. **2**, Leipzig (1911). — Ruhland und Hoffmann: Die Permeabilität von Beggiatoa mirabilis. Arch. wiss. Bot. **1**, 1 (1925).

Sakamura: Die Wirkung der Elektrolyte auf die Lebenserscheinungen von Gonium pectorale und Pandorina morum. Bot. Mag. (Tokyo) **38** (1924); (Resumé dans Jap. Journal of Bot. **2**, No. 4, p. 61). — Senn: Über einige koloniebildende einzellige Algen. Bot. Ztg. **57**, 39 (1899). — Spek: Beiträge zur Kolloidchemie der Zellteilung. Kolloidchem. Beih. **12**, 1 (1920). — Spiro: Über Lösung und Quellung von Kolloiden. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **5**, 276 (1904).

Vischer: Sur le polymorphisme de l'Ankistrodesmus Braunii. Rev. d'Hydrologie **1**, 5 (1920); Etudes d'Algologie expérimentale, Formation des stades unicellulaires, cénobiaux et pluricellulaires chez les genres Chlamydomonas, Scenedesmus, Coelastrum, Stichococcus et Pseudendoclonium. Bull. Soc. Bot. Genève **18**, 22 (1926). — Voss: Die Wirkung überoptimaler Konzentrationen einiger Neutralsalze auf kokkoide Bakterien. Arch. Mikrobiol. **18**, 101 (1952).

Walter: Protoplasma- und Membranquellung bei Plasmolyse. Jb. wiss. Bot. **62**, 145 (1923); Die Hydratur der Pflanze. Jena 1913.

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 89—108 (1954).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

Einfluß von β-Indolylessigsäure und wasserlöslichen Wirkstoffen des Mais-Scutellums auf Keimung und Wachstum von Phycomyces Blakesleeanus*.

Von

Willibald Rother.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. November 1953.)

Die Studien über ein balancierendes System von Wuchs- und Hemmstoffen im pflanzlichen Organismus nehmen einen immer weiteren Raum in der pflanzlichen Wuchstofflehre ein. Dieser Wechselbeziehung zwischen Wuchs- und Antiwuchsstoffen entspricht durchaus die Korrelation zwischen Hormonen und Antihormonen bei Tieren. Im *Mais*-Scutellum konnte Pohl (1951a) einen „Hemmstoff" nachweisen, der die durch starke β-Indolylessigsäure- (IES-) Konzentrationen hervorgerufene Hemmung bei *Kresse*-Wurzeln (Pohl u. Tegethoff 1949, Pohl 1951a, Tegethoff 1951) und *Petunia*-Pollenschläuchen (Pohl 1951b) aufzuheben imstande war. Eine fördernde Wirkung übt der Scutellen-Extrakt weder auf die *Kresse*-Wurzeln noch auf die *Petunia*-Pollenschläuche aus. Wie Pohl und Rother (1953) bereits berichteten, ist auch bei *Phycomyces Blakesleeanus* der Scutellen-Extrakt in der Lage, eine durch starke IES-Konzentrationen verursachte Hemmung der Sporenkeimung und des submersen Mycelwachstums zu neutralisieren. Überraschend ist, daß darüber hinaus je nach der Menge des zugefügten Extraktes eine Förderung festgestellt werden kann. Der Analyse dieses Effektes, insbesondere der dabei eingreifenden Wirkstoffe des Scutellen-Extraktes, gelten die vorliegenden Untersuchungen.

A. Die Versuche.

I. Methode.

Als Ausgangsmaterial für die vorliegenden Versuche dienten Kulturen des +-Stammes von *Phycomyces Blakesleeanus*. Seine hohe Empfindlichkeit und die quantitative Abhängigkeit seines Myceltrockengewichtes von suboptimalen

* Unter Verwendung einer Dissertation der naturwissenschaftlich-mathematischen Fakultät der Universität Freiburg i. Br. mit dem gleichen Titel.

Herrn Prof. Dr. Oehlkers bin ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes verpflichtet. Herrn Dozenten Dr. Pohl danke ich für die Überlassung des Themas und wertvolle Hilfe und Ratschläge.

Vitamin B_1-Konzentrationen haben seine Eignung als Testobjekt in zahlreichen Untersuchungen bewiesen (Schopfer 1939, Thren 1941, Hurni 1945, v. Witsch 1948).

Die Nährstofflösung nach Schopfer (1939) hatte folgende Zusammensetzung: 30,0 g Glucose, 1,0 g Asparagin, 1,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 1000 cm³ quarzdestilliertes Wasser. Als Wirkstoff waren in 1000 cm³ Nährlösung 12,5 γ Vitamin B_1 enthalten. Alle Chemikalien stammten von der Fa. E. Merck, Darmstadt und waren durch den höchst erhältlichen Reinheitsgrad ausgezeichnet.

Die Stammlösung wurde mit dem halben Volumen Aqua dest. angesetzt, so daß ihr Nähr- und Wirkstoffgehalt stets doppelt so hoch war, als der in den einzelnen Kulturkolben. Je 10 cm³ Nährlösung wurden in die sterilisierten Kulturkolben (100 cm³ Weithals-Erlenmeyer-Kolben) pipettiert und mit Aqua dest. auf 20 cm³ aufgefüllt oder unter Berücksichtigung des nach der Sterilisation noch hinzuzufügenden Volumens der die Wirkstoffe enthaltenden Lösungen entsprechend weniger, so daß das Endvolumen stets 20 cm³ betrug und in ihr eine optimale Vitamin B_1-Konzentration von 0,25 γ vorhanden war.

Der p_H-Wert der Nährlösung lag bei Kulturbeginn zwischen p_H 4,35 und 4,40; nach Kulturende im Mittel bei 2,95 und 3,00.

Die Sterilisation der Nährlösungen erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 30 min lang im strömenden Dampf. Wirkstofflösungen wurden vorsichtshalber nur einer einmaligen Sterilisation unterworfen. Die nach der zweiten Sterilisation auf Zimmertemperatur abgekühlten Kulturlösungen wurden im Impfkasten unter sterilen Bedingungen mit den entsprechenden Wirkstoffen beschickt und anschließend mit einem Tropfen einer Sporensuspension beimpft. Um möglichst homogenes Impfmaterial vorauszusetzen, wurden nur 5—8 Wochen alte Sporen verwendet. Auf 1 cm³ sterilisiertes Aqua dest. entfielen etwa 3 Sporangien. Die Sporenkonzentration lag in einem Größenbereich von etwa 2000 je Kultur.

Alle Kulturen standen in einem temperaturkonstanten (20° C $\pm$ 0 5°) Dunkelraum. Nur zeitweilig ist zur Beobachtung belichtet worden. Nach 8tägiger Kulturdauer kamen die nach kurzem Schütteln zusammengeballten Pilzmycele auf ein engmaschiges Messingsieb, wurden mit fließendem Leitungswasser und Aqua dest. gewaschen und danach zwischen mehreren Filtrierpapierlagen von überschüssigem Wasser befreit. Die zu einer Kugel gerollten Mycele wurden in numerierte Petri-Schalen gelegt, 4 Std lang bei 105° C getrocknet und anschließend abweichend von v. Witsch (1948) nicht in Wägegläschen, sondern nach Fries (1938) direkt auf der Analysenwaage gewogen.

Jede Kulturserie innerhalb eines Versuches bestand aus zehn Einzelkulturen. Jede der in dieser Arbeit vorkommenden Tabellen und Abbildungen enthält keine Einzelwerte, sondern die aus mindestens 3 Kulturserien (30 Einzelkulturen; bei Wachstumstesten 3mal je 5 Einzelkulturen) resultierenden Mittelwerte.

Zur Herstellung des Scutellen-Extraktes gelangte badischer Saatmais zur Verwendung. Dieser Extrakt wurde nach der Methode von Pohl (1951a) auf elektrodialytischem Wege gewonnen. Die für jede Extraktion benötigten 100 Scutellen wurden 24 Std lang vorgequollen. Die Diffusion der Molekel in die Kathodenkammer erfolgte durch ein Ultra-Cellafilter „feinst" der Membranfiltergesellschaft Göttingen, undurchlässig für Kongorot, somit unpassierbar für feinste Kolloide und Eiweiße. Bei einigen Extraktionen wurde ein Filter aus einem für Kongorot und somit für Eiweiße undurchlässigen Dialysierschlauch von der Fa. Kalle, Biebrich, verwendet.

Die Sporenkeimung wurde im hängenden Kulturtropfen nach der von Ruge (1947) angegebenen Methode untersucht. Die plangeschliffenen Glaszylinder hatten eine lichte Weite von 15 mm, eine Höhe von 10 mm und eine Wandstärke von 2,5 mm.

Die statistische Sicherung der Versuchsergebnisse erfolgte mit Hilfe der Varianzanalyse. Auf Grund von „STUDENTS" t-Verteilung und der Reststreuung wurde eine Mindestdifferenz (Δ) für $P = 0{,}01$ berechnet und bei den entsprechenden Tabellen und Abbildungen angegeben. Ist die Differenz zwischen zwei Mittelwerten $> \Delta$, so kann diese Differenz als gesichert angesehen werden.

II. Allgemeines zum Phycomyces-Test.

Die optimale Vitamin B_1-Konzentration wurde bei unseren Experimenten mit 0,25 γ/20 ml Nährlösung ermittelt. Es wurde damit ein Erntegewicht von 56 mg im Mittel erzielt.

Die Konzentration der Sporen übte in weiten Bereichen keinen Einfluß auf das Erntegewicht aus. Kulturserien mit 32000 Sporen im Mittel zeigten nach 8tägiger Kulturdauer im Erntegewicht keine gesicherte Differenz gegenüber einer Serie mit nur 400 Sporen im Mittel. Trotz konstanten Kulturbedingungen — thermokonstante Dunkelkammer, homogenes Impfmaterial — traten zu Beginn der Untersuchungen Schwankungen im Erntegewicht auf, die auf die Form der Kulturkolben zurückgeführt werden konnten. Es wurden gleichzeitig Kulturen in zwei verschiedenen Kolbentypen (2DO und ZG 20) angesetzt, die sich in der Größe ihrer Grundfläche voneinander unterscheiden. Bei gleichem Nährlösungsvolumen von 20 ml lag bei dem Kolbentyp 2DO der Flüssigkeitsspiegel höher, als bei dem Kolbentyp ZG 20. Die Erntegewichte der Kulturen in beiden Kolbentypen differierten um 5,9 mg nach dem 4. Kulturtag (ZG 20: 35,0 mg; 2 DO: 29,1 mg). Nach dem 8. Kulturtag hatte sich die Differenz verringert, lag jedoch mit 2,5 mg noch außerhalb von Δ (ZG 20: 57,5 mg; 2 DO: 55,0 mg). Als Ursache für dieses Verhalten konnten wir die Sauerstoff-Tension der Nährlösung verantwortlich machen. Kamen die Kulturen mit dem höheren Flüssigkeitsspiegel (2DO) in den ersten 24 Std ihrer Entwicklung unter eine mit Sauerstoff gesättigte Glasglocke, so konnte weder nach dem 4. noch 8. Kulturtag eine Retardation gegenüber den unbehandelten Kulturen der Serie ZG 20 beobachtet werden. Es liegt wohl beim submersen Mycelwachstum ein hoher O_2-Verbrauch vor, dem nur ein geringer O_2-Nachschub entgegensteht.

Diese Ergebnisse weisen auf die Notwendigkeit hin, nur Kulturen in einem bestimmten Kolbentyp heranzuziehen, wenn die Ergebnisse für einen quantitativen Test herangezogen werden sollen.

Ein Vergleich der monatlichen Mittelwerte des Erntegewichts innerhalb eines Jahres ergibt ein Maximum im Sommer und ein deutlich ausgeprägtes Minimum während der Wintermonate. Der Tiefstpunkt aller Werte lag im Monat Februar (1952) mit 53,3 mg im Mittel. Ab März stiegen die Erntegewichte wieder an (54,7 mg) und erreichten in den Monaten Juli bis September (56,9; 57,0; 57,0 mg) ihre Maximalwerte. Die mittleren Januar- und Februarwerte waren gegen alle Mittelwerte

der Monate April bis November statistisch gesichert. Ob hier ein jahreszeitlicher Rhythmus vorliegt, kann an Hand des vorliegenden Materials, das sich nur über $1\frac{1}{2}$ Jahre hin erstreckt, natürlich nicht entschieden werden.

III. Die Wirkung von elektrodialytisch gewonnenem wäßrigen Scutellen-Extrakt auf das Wachstum von Phycomyces.

Vorversuche ließen erkennen, daß der durch Elektrodialyse gewonnene Scutellen-Extrakt das Wachstum von *Phycomyces* gleichmäßig fördernd beeinflußte. Die bei den *Kresse*-Wurzeln (Pohl u. Tegethoff 1949; Pohl 1951a; Tegethoff 1951) und den *Petunia*-Pollenschläuchen (Pohl 1951b) festgestellte Hemmung konnte

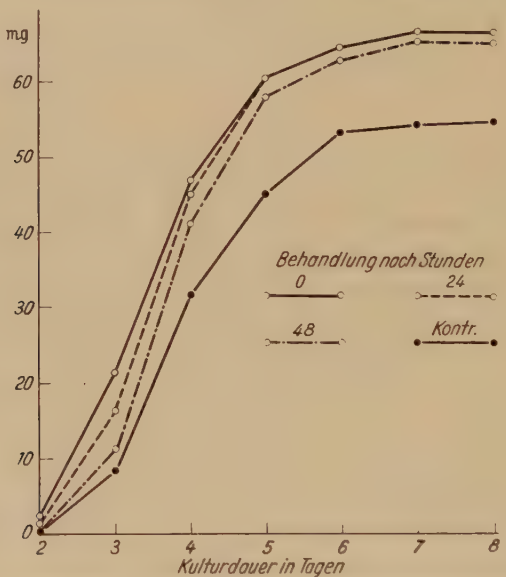


Abb. 1. Zu Beginn, nach 24 und 48 Std Kulturzeit mit 2 ml Extrakt behandelte Kulturen; tägliche Trockengewichtsbestimmungen. $A = 1{,}6$.

nicht beobachtet werden. Es war darum naheliegend zu untersuchen, ob dieser „Hemmstoff" mit dem auf *Phycomyces* wirkenden Förderungsstoff identisch ist, oder ob hier mindestens zwei ganz verschiedene Stoffe oder Stoffgruppen vorliegen, die unabhängig voneinander oder komplex in den physiologischen Prozeß eingreifen.

Wurde der Extrakt (2 ml) zu verschiedenen Zeiten (0, 24 und 48 Std nach Ansatz) den Kulturen zugesetzt und nach dem 3. Kulturtag tägliche Trockengewichtsbestimmungen durchgeführt, so ergaben diese das in Abb. 1 dargestellte Kurvenbild. Die zu Beginn und die nach 24 Std behandelten Kulturen zeigten nach Kulturende ein gegenüber der Kontrolle erhöhtes aber unter sich gleiches Erntegewicht. Die erst nach 48 Std behandelten Kulturen wiesen gegenüber der Kontrolle und gegenüber den anderen Serien in allen Punkten des Kurvenverlaufes eine ge-

sicherte Differenz auf. Gleiches Verhalten zeigten Kulturen, die anstatt mit 2 ml Extrakt, nur mit 1 ml behandelt worden waren. Die Erntegewichte lagen hier entsprechend tiefer.

Diese Versuche deuteten darauf hin, daß der Pilz auf den Scutellen-Extrakt besonders während seines submersen Wachstums anspricht. Um dies zu bekräftigen, wurde der Pilz zu Kulturbeginn und nach verschiedenen Kulturzeiten mit je 2 ml Extrakt behandelt. Bis zum Zeitpunkt der Behandlung wuchs der Pilz als normale Kontrolle. Es war auffallend, daß das submerse Mycelwachstum in den ersten 3 Entwick-

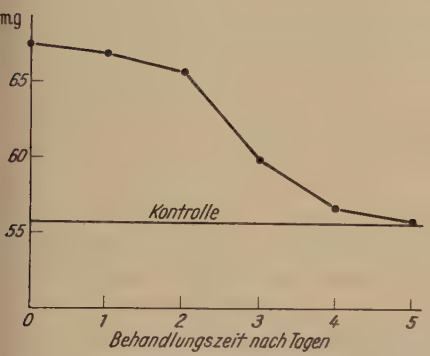


Abb. 2. Zu Beginn und nach verschiedenen Entwicklungszeiten mit 2 ml Scutellen-Extrakt behandelte Kulturen; Erntegewicht nach einer 8tägigen Kulturzeit in mg. $\Delta = 0{,}8$.

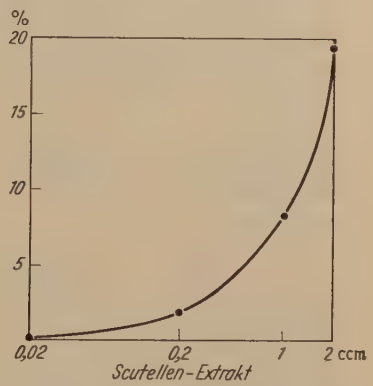


Abb. 3. Prozentuale Förderung der mit Scutellen-Extrakt behandelten Kulturen.

lungstagen so gefördert wurde, daß bereits 24 Std nach der Behandlung ein deutlicher Unterschied gegenüber der Kontrolle beobachtet werden konnte (Abb. 2). Eine statistisch gesicherte Differenz war zwischen der Kontrolle und den nach dem 5. Kulturtag behandelten Kulturen nicht mehr feststellbar. Die größte Empfindlichkeit für den Extrakt lag in den ersten 48 Std der Entwicklung. Nach dem 5. Kulturtag konnte das submerse Mycelwachstum bei den vorliegenden Versuchen nahezu als abgeschlossen betrachtet werden.

Um die noch wirksame Grenzkonzentration festzustellen, wurden die *Phycomyces*-Kulturen mit verschiedenen Extrakt-Quantitäten (2,0; 1,0; 0,2 und 0,02 ml) behandelt und die Erntegewichte nach 8tägiger Kulturdauer ermittelt. Nach Abb. 3 liegt offensichtlich eine Abhängigkeit der Trockengewichte von der Menge des zugefügten Extraktes vor. Mit Ausnahme der mit 0,02 ml Extrakt behandelten Kulturen, waren alle übrigen Werte gegenüber der Kontrolle statistisch gesichert. Bereits nach 24 Std konnten bei der stärksten Extrakt-Konzentration die ersten Mycelspuren beobachtet werden (Kontrolle: 36 Std). Entsprechend

früher entwickelte sich das submerse Mycel zu einer kräftig geschlossenen Decke, auf der nach etwa 80 Std Kulturdauer die ersten Sporangiophoren sichtbar waren.

Alle bisher erhaltenen Versuchsergebnisse lassen eine Abhängigkeit der Trockengewichte von der zugefügten Extraktmenge erkennen. Um diesen Befund noch weiterhin zu stützen, wurden 100 ml Extrakt, gewonnen aus 400 Scutellen, in einer Abdampfschale auf einem siedenden Wasserbad bis zur beginnenden Sirupkonsistenz eingeengt und anschließend in 9,5 ml Aqua dest. unter Zufügen von 1—2 Tropfen einer 0,1 n HCl gelöst. Das Substanzgemisch lag nach dem Eindampfungsprozeß in einer 10fach stärkeren Konzentration vor. Nach der Sterilisation kamen abgestufte Mengen dieses Konzentrates in die zu behandelnden Kulturen. Die von uns erwartete verstärkte Förderung nach dem 8. Kulturtag blieb aus. 1 ml Extrakt löste nur eine Förderung von 29% aus (Erntegewicht: 68,6 mg; Kontrolle: 53,3 mg). Die mit 0,2 ml Extrakt erzielte Förderung betrug 5,8%, während 0,02 ml Extrakt völlig wirkungslos waren.

Bedeutend höher lagen die Förderungsprozente, wenn der Extrakt im Vakuum bei 36—40° C eingeengt wurde. Der farblose, am Boden und an den Seitenwänden des Claisenkolbens niedergeschlagene Rückstand wurde in 10 ml Aqua dest. und 1—2 Tropfen einer 0,1 n HCl wieder aufgenommen, sterilisiert und anschließend getestet. 1 ml des so eingeengten Extraktes löste eine Förderung von 83,5% aus (Tab. 1). Das submerse

Tabelle 1. *Mit einem im Vakuum 10fach konzentrierten Scutellen-Extrakt und mit seinem Destillat behandelte Kulturen. $\Delta = 1{,}8$.*

	ml Extraktmenge			Destillat	Kontrolle
	1,0	0,2	0,02	2 ml	
Erntegewicht in mg . . .	100,4	67,3	55,8	55,1	54,7
Förderung in %	83,5	22,9	2,1	—	

Mycel war dabei überaus kräftig entwickelt und die Myceldecke fest ineinander verwoben. Die Sporangiophoren zeigten ein büschelförmiges Bild. Die nächst tiefere Konzentration entsprach 2 ml des Ausgangsextraktes. Die Förderung betrug hier 22,9%. Mit 0,02 ml Extrakt wurde kein gesicherter Effekt erzielt. Das Destillat hatte keine Wirkung auf das Wachstum der Pilze. Der Vergleich dieser beiden Experimente weist darauf hin, daß beim Eindampfungsprozeß auf der offenen Abdampfschale eine partielle Inaktivierung der Wirkstoffmolekel erfolgt.

Auch der Prozentsatz der Sporenkeimung konnte mit Hilfe des Scutellen-Extraktes erhöht werden. Er lag bei den mit Extrakt behandelten Kulturen (Verdünnung 1:10) bei 54,8%, während der Kontrollwert 40,8% erreichte; Kulturdauer 18 Std lang im hängenden Kulturtropfen.

Es müssen demnach im Extrakt Stoffe angenommen werden, die die ersten stoffwechselphysiologischen Prozesse in der Spore beeinflussen und den nichtkeimenden, aber keimpotenten Sporen entweder fehlen oder in ihnen in unzureichender Konzentration vorliegen.

IV. Analyse des Scutellen-Extraktes auf seine wachstumsfördernden Komponenten.

1. Voruntersuchungen des Extraktes.

Als Grundlage zur Analyse der das Pilzwachstum fördernden Komponenten des Scutellen-Extraktes wurden zunächst Trockengewichtsbestimmungen des Extraktes durchgeführt. Dabei ergaben 3 Proben von je 200 ml Extrakt 206, 212 und 210 mg Trockensubstanz. Diesen entspricht somit 1,05 mg Trockensubstanz auf 1 ml Extrakt. Nach Veraschen dieser Substanz verblieb ein Rückstand von 0,25 mg/ml Extrakt. Der größte Teil der Trockensubstanz besteht also aus organischen Stoffen.

Einige qualitative grobe Voruntersuchungen auf Aminosäuren mit Millons-Reagenz, auf Indolderivate mit Mitchell-Reagenz (1938/39) und mit Jod auf Doppelbindungen verliefen negativ.

Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl ergaben einen Stickstoffgehalt von 1,47%. Ausgangsmaterial für diese Bestimmungen war ein auf dem Wasserbad bis zur Trockne eingedampfter Extrakt.

Phosphor und Schwefel wurden im Extrakt mit Ammoniummolybdat, bzw. Bleiacetat nachgewiesen.

Mit Fehling zeigte der unbehandelte Extrakt keine Reaktion; erst nach Hydrolyse mit 2 n HCl verlief die Reaktion positiv. Offensichtlich liegen im Extrakt in erster Linie demnach Disaccharide (Saccharose oder Derivate derselben) vor. Eine titrimetrische Zuckerbestimmung nach Betrand (zit. bei Rona 1926) ergab 0,50 mg Zucker in 1 ml Extrakt. Diese Zuckermenge macht die Hälfte der Trockensubstanz aus.

2. Nachweis von Vitamin B_1 im Extrakt.

Zur Überprüfung des Scutellen-Extraktes auf Vitamin B_1 und auf eine andere, für den Pilz als Nährstoff verwertbare Stickstoffverbindung wurden zur Nährlösung ohne Vitamin B_1 oder Asparagin, bzw. ohne Vitamin- und Stickstoffquelle je 2 ml Extrakt gegeben. Das Ergebnis ist in nachstehender Aufstellung zusammengefaßt:

Normale Nährlösung	+ 2 ml Sc.-E. = 66,4 mg;	Kontr. = 55,7 mg
Nährlösung ohne Vit. B_1	+ 2 ml Sc.-E. = 45,0 mg;	Kontr. = 2,4 mg
Nährlösung ohne Aspar.	+ 2 ml Sc.-E. = 1,31 mg;	Kontr. = 0,26 mg
Nährl. ohne Vit. u. Aspar.	+ 2 ml Sc.-E. = 1,30 mg;	Kontr. = 0,26 mg.

Kontrolle jeweils ohne Scutellen-Extrakt.

Im Extrakt liegt demnach Vitamin B_1 in einer für das Pilzwachstum unteroptimalen Menge vor, eine als Nährstoff verwertbare Stickstoffquelle dagegen nicht. Eine quantitative Vitamin B_1-Bestimmung ist insofern schwierig, als der Extrakt das Wachstum des Pilzes, wie wir sahen, auch bei optimaler Vitamin B_1-Gabe noch zu steigern vermag. Es ist zu erwarten, daß diese Stimulation des Wachstums auch bei unter-

optimaler Wirkstoffmenge gegeben ist. Um aber ein ungefähres Bild vom Vitamin B_1-Gehalt des Extraktes zu erhalten, wurden einige Versuche mit verschiedenen Extraktmengen und Vitamin B_1-Gaben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Zusammenstellung wiedergegeben:

Normale Nährlösung	+ 2 ml Sc.-E. = 67,3 mg;	Kontr. = 55,5 mg
Normale Nährlösung	+ 1 ml Sc.-E. = 61,2 mg;	
Nährlösung ohne Vit.	+ 2 ml Sc.-E. = 44,6 mg;	
Nährlösung ohne Vit.	+ 1 ml Sc.-E. = 29,6 mg;	
Nährlösung + 0,13 γ Vit.	+ 2 ml Sc.-E. = 67,0 mg;	
Nährlösung + 0,04 γ Vit.	+ 1 ml Sc.-E. = 39,2 mg.	

Bei optimalem Vitamin B_1-Gehalt der Nährlösung beträgt die Förderung einer Zugabe von 2 ml Extrakt 21%, von 1 ml 10,3%. Unter der Annahme, daß die gleiche Förderung auch bei einem unteroptimalen Wirkstoffgehalt gegeben ist, würde das durch den Vitamin B_1-Gehalt des Extraktes erreichte Endgewicht ohne normale Vitamin B_1-Gabe 44,6 mg — 9,4 mg (21%) = 35,2 mg, bzw. 29,0 mg — 3 mg (10,3%) = 26,0 mg betragen. Nach einer Testkurve mit sub- bis supraoptimalen Vitaminkonzentrationen ergeben diese Werte eine Vitamin B_1-Konzentration von 0,08 γ je 2 ml Extrakt, bzw. 0,045 γ je 1 ml Extrakt. Die wahre Vitaminkonzentration dürfte demnach um 0,04 γ/1 ml Extrakt liegen. Die Versuchsergebnisse bei Ansatz von 0,13 γ Vitamin B_1 zu 2 ml Extrakt, bzw. von 0,04 γ zu 1 ml Extrakt, bestätigen diesen Befund. Im ersten Fall wird die optimale Wirkstoffkonzentration, die bei 0,20 γ liegt, erreicht; das Erntegewicht erreicht den maximalen Wert von 67 mg. Das Erntegewicht im zweiten Fall von 39,2 mg entspricht dem Erntegewicht von 0,08 γ Vitamin B_1 = 35 mg + 3,5 mg (10%) Förderung.

Anschließend sei noch erwähnt, daß das Vitamin B_2 in der Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ g/20 ml Nährlösung und das Vitamin B_{12} in einer Konzentration von 1 γ/20 ml Nährlösung keinen Effekt auf das Wachstum des Pilzes hatten. Wirkungslos war ferner das Nicotinsäureamid in den Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-7} mol.

3. Papierchromatographische Analyse des Extraktes.

Eine weitere Analyse der organischen Substanz im Scutellen-Extrakt wurde mit Hilfe der Papierchromatographie durchgeführt.

Als Papier wurde Whatman 1 verwendet. Für alle chromatographischen Untersuchungen kam die aufsteigende Methode nach Williams-Kirby (1948) in Anwendung. Das zu untersuchende Substanzgemisch lag in allen Fällen in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-2}$ g/ml vor, also in einem 20fach im Vakuum konzentrierten Extrakt, bei Annahme von 1 mg Trockensubstanz (wahrer Wert 1,05 mg) je 1 ml Extrakt. Für jeden Startpunkt wurden für die ersten qualitativen Untersuchungen bei einem zweimaligen Auftragen 5 mm^3 verwendet, eine Menge, die 0,1 ml des Ausgangsextraktes entsprach. Chromatographiert wurde stets in einem temperaturkonstanten Dunkelraum bei 20° C. Als Lösungsmittel fanden folgende Gemische Verwendung:

a) n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) in ml
b) Phenol-Wasser (4:1) in g
} zit. in CRAMER 1953;
c) Methanol-konz. Ammoniak-Wasser (90:2:8) in g (DECKER u. RIFFART, 1950).

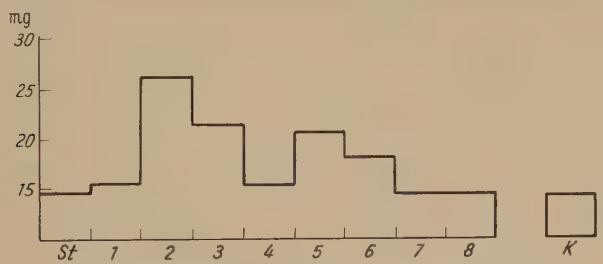
Mit Hilfe der papierchromatographischen Methode konnten 9 verschiedene Aminosäuren erkannt werden (Abb. 6). Zur Kenntlichmachung der Aminosäuren wurde als Reagens eine 0,2%ige Ninhydrinlösung in 95% Butanol und 5% 2 n Essigsäure verwendet. Eine genaue Identifizierung der Aminosäuren lag nicht in dem Bereich dieser Arbeit, zumal ein Vergleich der erhaltenen R_f-Werte nicht mit den R_f-Werten eines Leitchromatogrammes möglich war, da im Extrakt eine beträchtliche Menge störender Kationen vorliegen.

Ferner konnten im Extrakt 3 verschiedene Zucker identifiziert werden: Saccharose, Glucose und Fructose. Ein 4. Zucker konnte nicht näher analysiert werden; vermutlich handelt es sich um eine methylierte Fructose (Abb. 6).

Weder der Gehalt an Zucker noch die Aminosäuren können für den das Pilzwachstum stimulierenden Effekt des Extraktes verantwortlich gemacht werden, wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird.

4. Nachweis der wirksamen Substanzen im Extrakt nach chromatographischer Trennung.

Um nun die Wanderungsgeschwindigkeit der im Scutellen-Extrakt vorliegenden Wirkstoffe zu erfassen, wurde das im Vakuum eingeengte Konzentrat mit dem Methanol-Gemisch chromatographiert, der Streifen



Start (*St*) und Felder (*1—8*) des Chromatogrammes; *K* Kontrolle.

Abb. 4. Mit den Eluaten der auf papierchromatographischem Wege getrennten Substanzen des Scutellen-Extraktes behandelte Kulturen. Erntegewichte nach dem 3. Kulturtag. Nach dem 8. Tag zeigten alle Erntegewichte den Kontrollwert.

in Start und 8 gleiche Felder eingeteilt, mit Aqua dest. eluiert, einmal sterilisiert und anschließend die Eluate eines jeden Feldes getestet. Nach dem 3. Kulturtag konnte eine deutliche Stimulation des Pilzwachstums mit dem Eluat des Feldes 2 ermittelt werden (Abb. 4). Ein geringfügiger Teil der wachstumsfördernden Substanz schien noch in das Feld 3 hinübergewandert zu sein. Eine weitere Förderung wurde mit den Eluaten der Felder 5 und 6 erzielt. Das Vitamin B_1 wandert zwar bis Feld 6

hinauf, ist aber nicht mit diesem Wirkstoff identisch, da das Aneurin bereits optimal in der Nährlösung vorliegt. Das Vitamin kommt frei vor und ist nicht an die Phosphorsäure gebunden, denn diese ist, wie Untersuchungen mit der Molybdänblau- und Ammoniummolybdat-Reaktion zeigten, zu $^2/_3$ auf Feld 1 lokalisiert und reicht nur zu etwa $^1/_3$ in Feld 2 hinüber. Die nach dem 3. Kulturtag beobachteten Wachstumsförderungen der Versuchskulturen wurden bis zum 8. Kulturtag von den Kontrollen aufgeholt. Bereits nach dem 5. Kulturtag waren die Differenzen, wie einige Proben bestätigten, bereits ausgeglichen.

Es lag daher die Vermutung nahe, daß im Extrakt mindestens zwei verschiedene Stoffe vorliegen, die bei ihrem Zusammenwirken eine erhöhte Substanzproduktion ermöglichen. Kombinationsversuche, bei denen die Eluate zwei verschiedener Felder gleichzeitig einer Kultur zugegeben wurden, bestätigten diese Vermutung. Bei diesen Versuchen fanden Trockengewichtsbestimmungen nach dem 2. und 8. Kulturtag statt. Von den

Tabelle 2. *Mit den Eluaten kombinierter Felder des Scutellen-Extrakt-Chromatogrammes behandelte Kulturen. Aufgezeichnet wurden nur diejenigen Werte in Prozent, deren Felder einzeln oder in Kombination ein statistisch gesichertes Mehrwachstum gegenüber der Kontrolle aufwiesen. Trockengewichtsbestimmungen nach dem 2. und 8. Kulturtag.*

8. Kulturtag

Feld	2	3	5	6
2	0 / 250	0	8,6	6,0
3	250	0 / 162	3,0	4,2
5	225	162	0 / 50	0
6	238	175	75	0 / 62,5

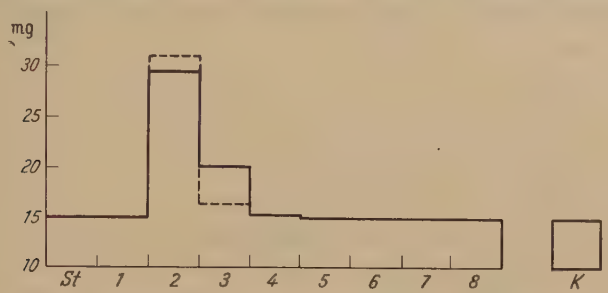
2. Kulturtag

256 erhaltenen Kombinationswerten sind der Übersichtlichkeit wegen nur diejenigen Felder herausgegriffen worden, die allein oder in Verbindung mit dem Eluat eines anderen Feldes entweder auf das submerse Mycelwachstum oder auf das Endgewicht nach einer 8tägigen Kulturdauer einen fördernden Effekt hatten. Dieser Voraussetzung entsprachen die Felder 2, 3, 5 und 6 (Tab. 2). Der fördernde Effekt auf das Endgewicht nach 8 Kulturtagen war am größten, wenn Feld 2 mit den Feldern 5 und 6 kombiniert wurde. Die Eluate gleicher Felder untereinander getestet, hatten keinen Einfluß auf das definitive Trockengewicht.

Nach dem 2. Kulturtag wurde die Förderung in erster Linie durch die Eluate der Felder 2 und 3 bestimmt. Die Eluate der Felder 5 und 6 waren erheblich weniger wirksam.

5. *Identifizierung der keimungsfördernden Substanz.*

Vorversuche in Anlehnung an die Experimente von Hurni (1945) hatten ergeben, daß Hypoxanthin das submerse Mycelwachstum fördernd beeinflußt, aber keinen Effekt mehr auf das Trockengewicht nach einer 8tägigen Kulturdauer hat. Eine ganz ähnliche Beobachtung konnte bei den aus den Feldern 2, 3, 5 und 6 eluierten Wirkstoffen gemacht werden. Nach dem 5. Entwicklungstag war auch hier die fördernde Wirkung kaum noch feststellbar, wenn die Eluate getrennt getestet



Start (*St*) und Felder (*1—8*) des Chromatogrammes; *K* Kontrolle.

Abb. 5. Mit Hypoxanthin und Guanin behandelte Kulturen. Die Wirkstoffe wurden chromatographiert und ihre Wanderungsgeschwindigkeit mit Hilfe des biologischen Testes bestimmt. Erntegewicht nach 3 Tagen Kultur. —— Hypoxanthin, --- Guanin.

wurden. Es lag nahe, die Frage zu prüfen, ob nicht einer dieser Wirkstoffe Hypoxanthin oder Guanin sei. Für diese Überprüfung wurden 136 γ Hypoxanthin (Fa. Schuchardt, München) und 154 γ Guanin (Fa. Hoffmann La Roche, Berlin) chromatographiert, die Streifen in Start und 8 gleiche Felder eingeteilt und anschließend mit Aqua dest. eluiert. Die Eluate wurden getestet und nach 3tägiger Kulturdauer die Trockensubstanz gravimetrisch bestimmt.

In Abb. 5 sind die Resultate dieses Versuches mit Hypoxanthin und Guanin wiedergegeben. Beide Verbindungen lagen vorwiegend in Feld 2. Das Hypoxanthin reichte jedoch noch ein wenig in Feld 3 hinüber, während das Guanin ausschließlich auf Feld 2 lokalisiert blieb, dementsprechend das Trockengewicht der mit Guanin behandelten Kulturen etwas höher lag. Vermutlich spricht *Phycomyces* gleich stark auf beide Purinderivate an. Auf Grund dieser Versuchsergebnisse müssen wir annehmen, daß mindestens das Hypoxanthin im Scutellum vorliegt. Ob daneben auch noch das wirksame Guanin vorkommt, kann nicht gesagt werden, da der wirksame Bereich des Hypoxanthins auf den Streifen den Bereich des Guanins vollkommen überdeckte.

Hypoxanthin scheint allein für die Erhöhung der Keimprozente verantwortlich zu sein. Für die Förderung des definitiven Trockengewichtes ist sowohl das Hypoxanthin, als auch ein noch unbekannter Wirkstoff

in Feld 5 und 6 erforderlich, der bei der Chromatographie teilweise seine Wirksamkeit verliert.

Parallelversuche mit *Kresse*-Wurzeln zeigten, daß der „Hemmstoff" des *Mais*-Scutellums (Pohl 1951a) mit keinem der hier isolierten Wirkstoffe des Scutellums identisch ist. Die größte Hemmung erzielten bei den *Kresse*-Wurzeln die Eluate der Felder 3 und 4 (Abb. 6).

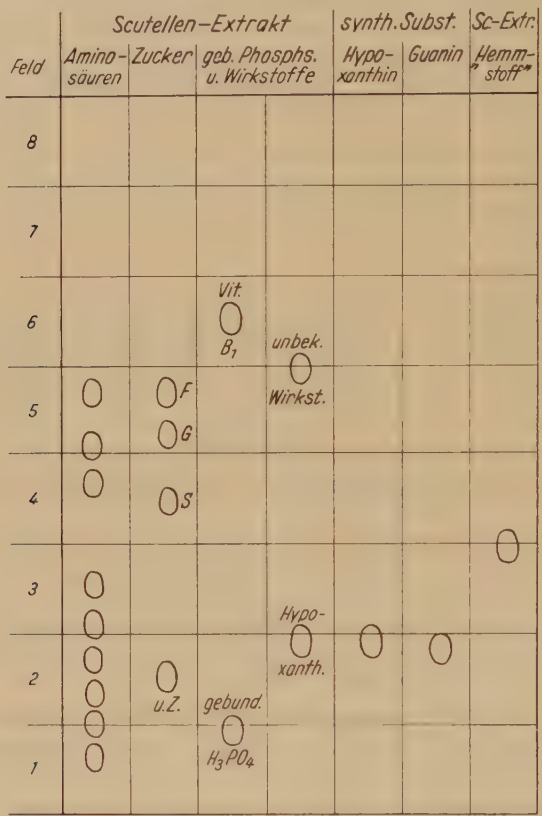


Abb. 6. Schema der Wanderungsgeschwindigkeiten der von uns isolierten Substanzen des Mais-Scutellums mit Hilfe der Papierchromatographie. Zwei synthetische Substanzen (Hypoxanthin und Guanin) liefen parallel. Der „Hemmstoff" des Mais-Scutellums wurde mit dem Kressewurzel-Test nachgewiesen. *F* Fructose; *G* Glucose; *S* Saccharose; *u. Z.* unbekannter Zucker.

V. Der Einfluß von Scutellen-Extrakt in Kombination mit IES auf das Wachstum von Phycomyces.

In einer früheren Arbeit (Pohl u. Rother 1953) konnte dort gezeigt werden, daß die IES in starken Konzentrationen ($5 \cdot 10^{-4}$ und $5 \cdot 10^{-5}$ mol) die Sporenkeimung und das submerse Mycelwachstum unterbindet. 18 Std nach Aussaat der Sporen zur Nährlösung gegeben, riefen $5 \cdot 10^{-4}$ mol IES nur noch eine partielle Hemmung von 6,3% hervor. Nach 3 Tagen normaler Entwicklung des Pilzes war

die IES in dieser Konzentration wirkungslos. Eine Förderung konnte mit schwächeren IES-Konzentrationen in keinem der Experimente ermittelt werden.

Der Scutellen-Extrakt war in der Lage, eine durch $5 \cdot 10^{-4}$ mol IES hervorgerufene Totalhemmung wieder aufzuheben. Je nach der menge des zugefügten Extraktes konnte darüber hinaus noch eine Förderung resultieren. In Anlehnung an die Arbeiten von Pohl (1951a, 1951c, 1952) wurden zwei Indolderivate (β-Indolacetaldehyd und β-Indolyläthylalkohol) getestet. Beide neutralisierten eine mit IES hervorgerufene Totalhemmung. Benzaldehyd hatte keine Wirkung, die Hemmung blieb 100%ig bestehen.

Es ist darum wahrscheinlich, daß der „Hemmstoff" des Scutellums ein Indolderivat sein kann.

Derselbe *Phycomyces*-Stamm, mit dem diese Versuche durchgeführt worden waren, verlor nach einigen Monaten Kultur im Dunkelraum seine Sensibilität auf IES. Die mit $5 \cdot 10^{-4}$ mol IES erhaltene Totalhemmung, die starke Hemmung und die spätere Unterbindung des submersen Mycelwachstums bei der Konzentration $5 \cdot 10^{-5}$ mol waren nach einigen Monaten nicht mehr reproduzierbar. Nicht einmal eine IES-Konzentration von 10^{-3} mol war in der Lage, eine Totalhemmung der Sporenkeimung herbeizuführen (Tab. 3). Über die Ursache dieses Umschlages in der IES-Sensibilität können noch keine bestimmten Aussagen gemacht werden. Obwohl die Mycelspuren erst nach dem 3. Kulturtag auftraten, entwickelte sich das submerse Mycel, jedoch stark gehemmt, doch noch zu einer, wenn auch unvollständig geschlossenen Myceldecke. Am 6. Kulturtag zeigten sich die ersten, mit einem typisch

Tabelle 3. *Mit verschiedenen IES-Konzentrationen behandelte Kulturen des resistenten Phycomyces-Stammes; Kulturdauer 8 Tage; Erntegewichte in mg, darunter die in Prozenten angegebene Hemmung.* $\Delta = 0{,}8$.

mol IES in je 20 ml Nährlösung							Kontrolle
10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-10}	
40,6	46,6	54,0	55,1	55,5	55,8	55,2	55,8
27,2	16,5	3,2	—	—	—	—	

pathologischen Charakter ausgezeichneten Sporangiophoren, die bereits am nächsten Tag ihre Elastizität verloren und nach den Seiten hin umknickten. Diese hauchdünnen, kaum pigmentierten Sporangiophoren bildeten kaum sichtbare, aber funktionstüchtige Sporangien. Auch die nach den Seiten hin umgeknickten Sporangienträger behielten ihre phototropische Sensibilität bei. Die mit $5 \cdot 10^{-4}$ mol IES behandelten Kulturen waren kräftiger entwickelt und fast wieder normal pigmentiert. Die schwächeren IES-Konzentrationen hatten keinen Effekt. Die Ergebnisse der nach verschiedenen Entwicklungszeiten des Pilzes mit $5 \cdot 10^{-4}$ mol IES behandelten Kulturen gibt Tab. 4 wieder. Die IES schadet *Phycomyces* nicht mehr, wenn sie 24 Std nach Kulturbeginn

Tabelle 4. *Nach verschiedenen Kulturzeiten mit β-Indolylessigsäure behandelte Kulturen von Phycomyces; Kulturdauer 8 Tage; unter den Erntegewichten (in mg) ist die Hemmung in Prozenten angegeben. Δ = 1,5.*

Mit $5 \cdot 10^{-4}$ mol IES behandelte Kulturen nach Std							Kontrolle
0	12	18	24	48	72	96	
47,7	51,7	54,7	56,0	56,2	56,2	56,2	56,4
15,4	8,3	3,0	—	—	—	—	

zugegeben wird. Wie erinnerlich, endet die für IES empfängliche Phase bei dem sensiblen Stamm erst nach dem 3. Kulturtag.

Der Scutellen-Extrakt war in der Lage, auch die durch die IES bewirkte Hemmung bei dem resistenten Stamm wieder aufzuheben. In Anlehnung an die bereits mitgeteilten Versuche mit dem sensiblen Stamm (Pohl u. Rother 1953) wurden nun im weiteren Rahmen Gemische für den Test verwendet, die verschiedene Konzentrationen von IES und Scutellen-Extrakt enthielten. Folgende IES-Konzentrationen kamen zur Anwendung: 10^{-3}, $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} und 10^{-5} mol; von dem Extrakt drei wirksame Quantitäten: 2 ml, 1 ml und 0,2 ml. Diese Konzentrationen wurden so untereinander kombiniert, daß jeweils eine IES-Konzentration mit einer Extrakt-Konzentration zusammenkam. Alle Gemische wurden zu Kulturbeginn zugegeben. Die Ergebnisse sind in dem dreidimensionalen Diagramm in Abb. 7 dargestellt. Auf der „Vorderseite" des Diagrammes sind die IES-Konzentrationen aufgetragen, zugleich gibt die Vorderwand die Erntegewichte bei den einzelnen Wuchsstoffkonzentrationen wieder. Zur besseren Orientierung ist die 50 mg Linie kräftig ausgezogen. Die Extrakt-Mengen sind auf der rechten „Breitseite" abgetragen, jedoch müssen die Erntegewichte des reinen Extraktes auf der linken Seite, in Verlängerung der „Nullinie", abgelesen werden. Betrachten wir die Gemische mit der stärksten IES-Konzentration, so zeigt sich, daß die IES-Hemmung durch 0,2 ml Extrakt etwas verringert wird, bei 1 ml liegt das Erntegewicht noch bei 50,7 mg, während 2 ml die Hemmung gänzlich aufheben. Bei der nächst schwächeren Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ mol tritt nur eine parallele Verschiebung zur mehr fördernden Seite hin auf. Diese Verschiebung wird auch bei den schwächeren IES-Konzentrationen eingehalten, so daß hier, zumindest bei der IES-Konzentration 10^{-5} mol, die reine Extrakt-Wirkung dominiert. Dieser parallele Verlauf der Linien und die parallele Verschiebung bei schwächeren IES-Konzentrationen zur fördernden Seite hin, bis schließlich die reine Extrakt-Wirkung dominiert, deutet auf eine additive Wirkung der beiden Komponenten eines Gemisches hin, d. h., daß diese beiden Komponenten an verschiedenen Reaktionsorten im plasmatischen Gefüge der Sporen, bzw. der späteren Keimstadien angreifen und sich in ihrer Wirkung kompensieren.

Nach dem 5. Kulturtag hebt der Scutellen-Extrakt eine mit $5 \cdot 10^{-4}$ mol IES hervorgerufene Hemmung nicht mehr auf. Bei dem sensiblen Stamm hatte der Extrakt nach dem 3. Kulturtag keinen Einfluß mehr.

Wurden die Eluate der Felder eines Extrakt-Chromatogrammes den Kulturen zugegeben, die zu Beginn des Testes mit einer $5 \cdot 10^{-4}$ molaren IES behandelt worden waren, so hoben nur die Eluate der Felder 2 und 3 die IES-Hemmung wieder auf. Eine Förderung konnte darüber hinaus in keinem der Versuchsfälle experimentell ermittelt werden. In diesen beiden Eluaten ist Hypoxanthin, vielleicht auch Guanin enthalten. Wie

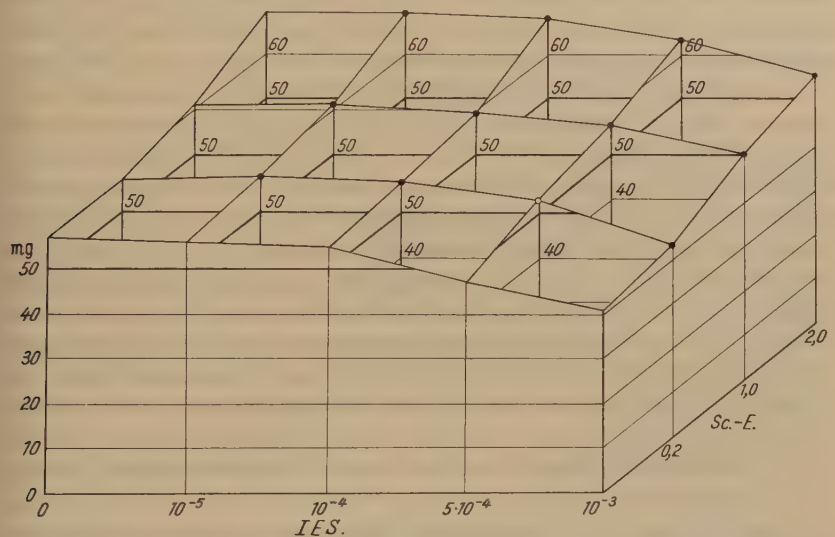


Abb. 7. Dreidimensionales Diagramm der Kombinationsversuche von IES mit Scutellen-Extrakt. Auf der „Vorderseite" sind die IES-Konzentrationen in Mol, auf der „Breitseite" die Mengen Extrakt in ml und auf der „Höhe" die Erntegewichte in mg abgetragen. Die 50 mg-Linie ist kräftig ausgezogen. Erntegewichte nach 8 Tagen Kulturzeit. $A = 1{,}2$.

Parallelversuche bestätigten, waren Hypoxanthin in einer Konzentration von 1,36 γ und Guanin in einer Konzentration von 1,54 γ in 20 ml Nährlösung imstande, die durch $5 \cdot 10^{-4}$ mol IES hervorgerufene Hemmung wieder aufzuheben.

B. Diskussion.

Die Untersuchungen ergaben zunächst, daß die optimale Vitamin B_1-Konzentration für 20 ml Nährlösung 0,25 γ beträgt. Die damit erzielten Erntegewichte stimmen im wesentlichen mit denen von Thren (1941) und v. Witsch (1948) überein. Abweichend von Schopfer (1939), der stets eine 25 ml fassende Nährlösung wählte und entsprechend höhere Erntegewichte zu verzeichnen hatte, arbeiteten wir mit einem Nährlösungsvolumen von 20 ml.

Da 400 Sporen nach einer 8tägigen Kulturdauer das gleiche Trockengewicht wie etwa 32000 Sporen zeigten, müßte sich theoretisch eine einzige, keimfähige Spore sowohl bei optimalen nativen wie synthetischen Nähr- und Wirkstoffbedingungen zu einem Mycel mit dem gleichen Trockengewicht entwickeln. Daß dieser „Idealfall" nicht erreicht werden kann, hat seine Ursache nicht in den für das Trockengewicht begrenzenden Faktoren, Asparagin und Aneurin, sondern in dem totalen oder partiellen Verlust eines das submerse Mycelwachstum beeinflussenden Wirkstoffes. Diese Hypothese fußt auf den Ergebnissen eingeschalteter Versuche, wonach 50—70 Sporen in 20 ml Nährlösung nur ein Trockengewicht von 18,7 mg hervorriefen. Wurden dieser Nährlösung 2 ml Scutellen-Extrakt zugefügt, so steigerte sich das Trockengewicht auf 24,5 mg.

Schwankungen im Trockengewicht bei Vollkulturen konnten unter anderem auf die Form der Kulturkolben zurückgeführt werden. Das submerse Mycelwachstum ist von der O_2-Tension der Nährlösung in weitem Maße abhängig; die Sauerstoffspannung der Nährlösung wird aber durch die Höhe des Flüssigkeitsspiegels beeinflußt. Die sehr geringen Trockengewichte, die Hurni (1945) nach dem 3. und 4. Kulturtag erhalten hatte (2,75 und 9,5 mg), können wohl auf eine geringe Sauerstoffspannung der Nährlösung zurückgeführt werden, denn Hurni arbeitete in 100 ml Kolben mit einer 25 ml fassenden Nährlösung. Nach dem 5. Kulturtag lag das Trockengewicht bei 49 mg. Vermutlich hatte das submerse Mycel zwischen dem 4. und 5. Kulturtag die Flüssigkeitsoberfläche erreicht.

Die Untersuchungen über den Einfluß von elektrodialytisch gewonnenem Scutellen-Extrakt führten zu dem Ergebnis, daß die Wirkung des Scutellen-Extraktes auf das submerse Mycelwachstum zeitlich begrenzt ist. Mit zunehmender Entwicklung nimmt die Empfindlichkeit gegen diesen Extrakt ab. Diese allmähliche Sensibilitätsverminderung vom 3. bis 5. Kulturtag kann dadurch erklärt werden, daß *Phycomyces* im zellphysiologischen Geschehen eine Umwandlung erfährt.

Eine Trennung der im Extrakt vorkommenden Wirkstoffe konnte mit Hilfe der Papierchromatographie erreicht werden. Neben dem Aneurin sind im Extrakt noch mindestens zwei andere auf *Phycomyces* wirksame Faktoren vorhanden. Diese Verbindungen haben getrennt getestet keinen Einfluß auf das Trockengewicht nach einer 8tägigen Kulturdauer. Erst die Kombination beider Wirkstoffe wirkt fördernd auf das definitive Erntegewicht. Der schnell wandernde Wirkstoff, der bei der Chromatographie einen Teil seiner Wirksamkeit verliert, konnte noch nicht identifiziert werden. Ein langsamer wandernder Wirkstoff ist in Anlehnung an die Experimente von Hurni (1945) als das von Robbins (1942) entdeckte, für *Phycomyces* wirksame Hypoxanthin erkannt worden. Robbins (1940, 1941) und seine Mitarb. fanden zwei aus Kar-

toffelknollen isolierte Faktoren Z_1 und Z_2. Z_1 ist an Holzkohle adsorbierbar und kann mit ammoniakalischem Aceton wieder eluiert werden, während Z_2 nicht an Holzkohle adsorbierbar ist. Z_1 wurde von Robbins und Kavanagh (1942) als Hypoxanthin identifiziert. Guanin zeigte den gleichen Förderungseffekt wie Z_1 (1942), ist aber nicht mit ihm identisch, da Guanin mit Salpetersäure zerstört wurde, der Z_1-Faktor und Hypoxanthin aber nicht. Beide Faktoren (Z_1 und Z_2) in passendem Verhältnis zugefügt, riefen Förderungen hervor, die größer waren, als wenn die Faktoren einzeln getestet wurden. Robbins erntete die Kulturen meist nach einer Kulturdauer von 72 Std. Leider liegen keine Angaben vor, ob die Förderung der getrennt zugefügten Faktoren auch nach einer Kulturdauer von 8 Tagen beibehalten wurde. Ob der bei der Chromatographie schnell wandernde Wirkstoff des Scutellen-Extraktes mit dem Faktor Z_2 identisch ist, muß offen bleiben.

Es ist möglich, daß Hypoxanthin in gebundener und freier Form in der Spore vorliegt und daß nur die freie Form wirksam ist. Dafür spricht die außerordentlich hohe Wirksamkeit des synthetischen Hypoxanthins. Bei den nicht-keimenden, aber keimpotenten Sporen scheint der Spiegel des freien Wirkstoffes so tief zu liegen, daß diese Konzentration für eine Keimung nicht ausreichend ist. Für ein Vorliegen von gebundenem Hypoxanthin sprechen auch die Untersuchungen von Robbins (1945), der mit Hilfe physikalischer Methoden (kurzfristige Temperaturerhöhung auf 50° C) eine Steigerung der Keimprozente erzielen konnte. Eine Erhöhung der Keimprozente scheint aber nur dann möglich zu sein, wenn dieser Wirkstoff relativ leicht in die freie Form übergehen kann.

Im kataphoretisch gewonnenen Scutellen-Extrakt liegen somit drei Wirkstoffe vor, von denen zwei (Hypoxanthin, evtl. auch Guanin und ein unbekannter Stoff) die Sporenkeimung und das Pilzwachstum positiv beeinflussen; der dritte Wirkstoff, vermutlich ein Indolderivat, hebt die durch IES induzierte Keimungshemmung der Sporen auf.

Bei den Untersuchungen über den Einfluß der IES auf das Wachstum von *Phycomyces* ergab sich, daß der verwendete *Phycomyces*-Stamm seine Reaktionsweise auf IES änderte. Über die Ursachen der spontanen Resistenzänderung gegenüber IES können keine bestimmten Aussagen gemacht werden. Es liegen Anhaltspunkte dafür vor, daß der Lichtfaktor hierbei eine Rolle spielt. Solange der Stamm sich auf IES sensibel erwies, standen die Stammkulturen in diffusem Tageslicht an einem Fenster der Nordseite. Später kamen diese Stammkulturen in die temperaturkonstante Dunkelkammer. Danach zeigten sie die geschilderte Resistenzerhöhung gegen IES. Nach einem Jahr wurden die Stammkulturen wieder in diffusem Tageslicht herangezogen. Nun konnte zwar eine Schwächung der Resistenz beobachtet werden, doch trat die volle Sensibilität wie zu Beginn unserer Versuche bisher nicht wieder auf.

Der gegen IES nunmehr resistente Stamm zeigte selbst in einer Nährlösung, die auf 20 ml 10^{-3} mol IES enthielt, noch ein beträchtliches Wachstum. Dem Augenschein nach war dabei die Pigmentierung der Sporangiophoren unterbunden, doch behielten diese Sporangienträger ihre phototrope Sensibilität bei.

Schopfer (1950) hatte mit einem Nährmedium auf Lactatbasis die Carotinbildung des Pilzes gänzlich unterdrücken können. Nach seinen Beobachtungen, die von Reinert (1952) bestätigt wurden, ist der carotinfreie Pilz phototropisch empfindlicher als der carotinhaltige. Unter Anwendung spezieller Nährsubstrate konnte Schopfer (1951) weiterhin zeigen, daß bei *Phycomyces* Na-Acetat eine Vorstufe des β-Carotins darstellt. Ob IES in diesen Stoffwechsel des Pilzes eingreift, ist noch zu klären.

Richards (1949) erhielt mit 10^{-3} mol IES eine Totalhemmung; alle Sporen blieben ungekeimt. Ihr Stamm verhielt sich also wie der unsrige vor Änderung seiner Sensibilität. Richards arbeitete nicht in Flüssigkeitskulturen, sondern mit einem Difco-Kartoffel-Dextrose-Agar-Nährmedium. Gemessen wurde die lineare Wachstumsrate nach einer 16 bis 40stündigen Kulturdauer. Die Ergebnisse von Umrath (1939) über den Einfluß von IES auf das Wachstum von *Phycomyces* sind statistisch nicht gesichert. Trotzdem wollen wir sie mit den unsrigen vergleichen. Umrath konnte mit einer IES-Konzentration von $8 \cdot 10^{-5}$ g/ml eine deutliche Verzögerung des submersen Mycelwachstums bewirken, während $5 \cdot 10^{-4}$ mol sehr stark hemmend wirkten, so daß nur Mycelspuren entwickelt wurden. Überraschend ist, daß *Phycomyces*-Extrakt imstande war, die IES-Hemmung aufzuheben. Er spricht von einem Heteroauxin-Antagonisten, der hier eine Rolle zu spielen scheint. Es ist noch zu prüfen, ob dieser Heteroauxin-Antagonist nicht ein Abbauprodukt der IES selbst ist, das nun mit dieser in Platzkonkurrenz tritt und die IES auch in hohen Konzentrationen unschädlich für den Stoffwechsel des Pilzes macht.

Das Vermögen des Scutellen-Extraktes, die durch IES induzierte schwache Wachstumshemmung des Pilzes aufzuheben, beruht nicht auf einem Antagonismus; nur solange der Stamm auf IES sensibel war, haben wir besonders bei der Sporenkeimung einen derartigen Antagonismus feststellen können (Pohl u. Rother 1953). Die wachstumsfördernde Wirkung des Extraktes kompensiert vielmehr indirekt die schwache IES-Wachstumshemmung. Beide Faktoren, IES und Wirkstoffe des Scutellums, greifen an verschiedenen Reaktionsorten im Plasma an und kompensieren sich in ihrer Wirkung. Der beim *Kresse*-Test eine Wachstumshemmung der Wurzel auslösende Wirkstoff des Scutellen-Extraktes (Pohl 1951a) ist offensichtlich mit der Substanz identisch, die beim sensiblen Stamm die Aufhebung der durch IES bewirkten Unterbindung

der Sporenkeimung bedingt. Bei der Chromatographie mit dem Methanol-Gemisch findet sich dieser Stoff in den Feldern 3 und 4, da diese Eluate allein das Wachstum der *Kresse*-Wurzeln hemmend beeinflussen (61,2 und 48,2%).

Zusammenfassung.

1. Für die vorliegenden Versuche wurde eine optimale Vitamin B_1-Konzentration von 0,25 γ für 20 ml Nährlösung ermittelt.

2. Als Ursache der Trockengewichtsschwankungen innerhalb der Methodik ist nicht die Sporenkonzentration verantwortlich, sondern die Sauerstoff-Tension der Nährlösung, die ihrerseits von der Form der Kulturkolben abhängig ist.

3. Bei unserem *Phycomyces*-Stamm wurde eine Abhängigkeit der Trockengewichte von der Jahreszeit ermittelt.

4. Der Scutellen-Extrakt wirkt quantitativ auf das Wachstum von *Phycomyces*. Mit zunehmender Entwicklung nimmt die Empfindlichkeit gegen diesen Extrakt ab. Nach dem 5. Kulturtag spricht *Phycomyces* nicht mehr auf die im Extrakt vorliegenden Wirkstoffe an.

5. Neben 9 verschiedenen Aminosäuren, Glucose, Fructose, Saccharose, vermutlich einer methylierten Fructose, freiem Vitamin B_1 und gebundener Phosphorsäure, konnte Hypoxanthin, evt. auch Guanin und ein noch unbekannter Wirkstoff erkannt werden. Diese beiden Wirkstoffe beeinflussen, getrennt getestet, nur das submerse Mycelwachstum. Nach dem 8. Kulturtag tritt eine Förderung nur dann ein, wenn beide Substanzen gleichzeitig gegeben werden.

6. Die in dieser Arbeit zusammengestellten Ergebnisse sind in erster Linie mit einem gegen IES partiell resistenten Stamm gewonnen worden. 10^{-3} mol IES rufen nur eine Hemmung von 27% nach dem 8. Kulturtag hervor. Die Pigmentierung wird bei dieser Molarität stark unterdrückt.

7. Die im Scutellen-Extrakt vorliegenden Wirkstoffe vermögen die IES-Hemmung aufzuheben. Zwischen der Wirkung der IES und der Wirkung des Extraktes liegt ein deutlich additiver Effekt vor, d. h., daß beide Wirkstoffe an zwei verschiedenen Reaktionsorten im Plasma angreifen. Die Aufhebung dieser durch IES induzierten Wachstumshemmung des Pilzes durch Scutellen-Extrakt beruht auf seinem Gehalt an Hypoxanthin, evtl. auch Guanin. Beide sind, wie der Scutellen-Extrakt, in der Lage, diese Hemmung aufzuheben.

Literatur.

Bertrand: zit. bei Rona, P.: Praktikum der physiologischen Chemie 1926. — Cramer, F.: Papierchromatographie, Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie G.m.b.H. 1953. — Decker, P., u. W. Riffart: Papierchromatographie mit wassermischbaren Lösungsmitteln. Chemiker-Ztg. 261, 1950. — Fries, Nils: Über die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum verschiedener Pilze. Symbolae bot.

Upsalienses III: **2**, 1—181 (1938). — Hurni, H.: Zusatzwachstumsfaktoren für Phycomyces Blakesleeanus. Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **16**, 69—80 (1945). — Mitchell, J. W., and B. C. Brunstetter: Colorimetric methods of indol (3) acetic acid. Bot. Gaz. **100**, 802—816 (1938/39). — Pohl, R.: Das Hemmstoff-Wuchsstoffsystem des Mais-Scutellums. Planta (Berl.) **39**, 105—125 (1951a). — Die Wirkung von Wuchsstoff und Hemmstoff auf das Wachstum der Pollenschläuche von Petunia. Biol. Zbl. **70**, 119—128 (1951b). — Die Wirkung von β-Indolacetaldehyd auf das Wachstum der Kressewurzeln. Ber. dtsch. bot. Ges. **64**, 132 bis 135 (1951c). — Das Wuchsstoff-Hemmstoffproblem der höheren Pflanze. Naturwiss. **39**, 1—8 (1952). — Pohl, R., u. W. Rother: Sporenkeimung und Mycelwachstum von Phycomyces Blakesleeanus unter dem Einfluß von Wuchs- und Hemmstoffen der höheren Pflanze. Biol. Zbl. **72**, 364—372 (1953). — Pohl, R., u. B. Tegethoff: Der Hemmstoff des Mais-Scutellums ein Wuchstoffinaktivator. Naturwiss. **36**, 319—320 (1949). — Reinert, J.: Über die Bedeutung von Carotin und Riboflavin für die Lichtreizaufnahme bei Pflanzen. Naturwiss. **39**, 47—48 (1952). — Richards, R. R.: Responses of representative fungi to certain growth regulating substances. Bot. Gaz. **110**, 523—550 (1949). — Robbins, W. J.: Effect of potato extract on growth of Phycomyces. Bot. Gaz. **101**, 912—927 (1940). — Further observations of factor Z_1. Bot. Gaz. **102**, 520—535 (1941). — Guanin and factor Z_1, growth substances for Phycomyces. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **28**, 4—7 (1942). — Effect of cotton on the germination of Phycomyces spores. Bull. Torrey. Bot. Club. **72**, 76—85 (1945). — Robbins, W. J., and Kavanagh: Hypoxanthin a growth substance for Phycomyces. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **28**, 65—69 (1942). — Rona, P.: Praktikum der physiologischen Chemie, Teil I. Berlin: Springer 1926. — Ruge, U.: Übungen zur Wachstums- und Entwicklungsphysiologie. Berlin und Göttingen: Springer 1947. — Schopfer, W. H.: Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Mikroorganismen. Erg. Biol. **16**, 1—172 (1939). — Recherches sur la biosynthèse des caroténoides chez un microorganisme par Phycomyces Blakesleeanus. Experientia (Basel) **7**, 218—219 (1951). — Schopfer, W. H. et al.: Recherches sur la biosynthèse des caroténoides chez un microorganisme. Experentia (Basel) **6**, 419—421 (1950). — Tegethoff, B.: Zur Frage der Wuchsstoffinaktivierung im Mais-Scutellum. Planta (Berl.) **38**, 648—683 (1951). — Thren, R.: Kritische Versuche zum biologischen Pilztest (Phycomyces-Wachstumstest) auf Vitamin B_1. Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **1**, 100—117 (1941). — Umrath, K.: Über Pilzwuchsstoffe mit spezifischer Wirkung. Protoplasma (Wien) **33**, 13—17 (1939). — Williams, R., and H. Kirby: Paper chromatographie using capillary ascent. Science (New York) **107**, 481 (1948). — Witsch, H. v.: Erfahrungen und Bemerkungen zum Phycomyces-Test auf Vit. B_1. Arch. f. Mikrobiol. **14**, 99—107 (1948).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 109—110 (1954).

(From the Institute of Microbiology, Uppsala.)

Some Observations on the Use of Cylinders Made from Different Materials in the Cylinder Plate Method.

By

GERDA NILSSON and PER ERIC NILSSON.

With 1 figure in the text.

(Eingegangen am 10. Dezember 1953.)

Originally the cylinder plate method for testing antibiotics included the use of cylinders made of glass *e.g.* Pyrex glass. The breakage percent of these glass cylinders is however high and as they had to be ground they were rather expensive. Later cylinders of vitreous porcelain were introduced. Now cylinders made of metal are in use in many laboratories working with this test method.

In this laboratory we use cylinders manufactured of stainless steel according to the type used in the institute of microbiology at Rutgers University, U.S.A. Before definetely choosing this material we investigated the possibility of using aluminium as this should make the cylinders much cheaper (about 25% of Pyrex in cost).

Cylinders of aluminium have been used before. According to H. W. FLOREY et al (1949) no other disadvantages have been reported than they become uneven and encrusted after some time of use. This makes the material unsuitable for cylinders to be used on agar. When melting them into the agar, which is the method used in this institute, it is however of little importance.

In order to find out whether any further disadvantage could be connected with the use of aluminium cylinders a comparison was made between the three materials, glass, stainless steel (tubes Uddeholm) and aluminium (tubes 25 H, Svenska Aluminiumkompaniet) in some experiments. The test organism used in the experiments was a strain of *Staphylococcus aureus.*

A representative experiment is shown on the figure.

The cylinders on all the plates shown by the figure were filled with sterile water. On the plates with aluminium cylinders very pronounced inhibition zones developed. The test organism on the plates with cylinders of glass and of stainless steel showed no sign of inhibition.

As according to HIRSCH (1950) certain antibiotics as *e. g.* nicin are extremely difficult to remove quantitatively from the cylinders and those used in the above experiment had been used in earlier experiments with unidentified antibiotics the experiment was repeated with cylinders not used before. These new cylinders, however, gave an inhibition zone of the same diameter.

The influence of different cleaning and sterilization procedures on the inhibition effect was also investigated. This experiment gave inhibition zones with diameters varying from 15 to 35 mm as shown by the figure. Wet sterilization gave a much higher inhibition effect (35 mm) than dry sterilization (15 mm). The use of a synthetic washing preparation did not influence the result.

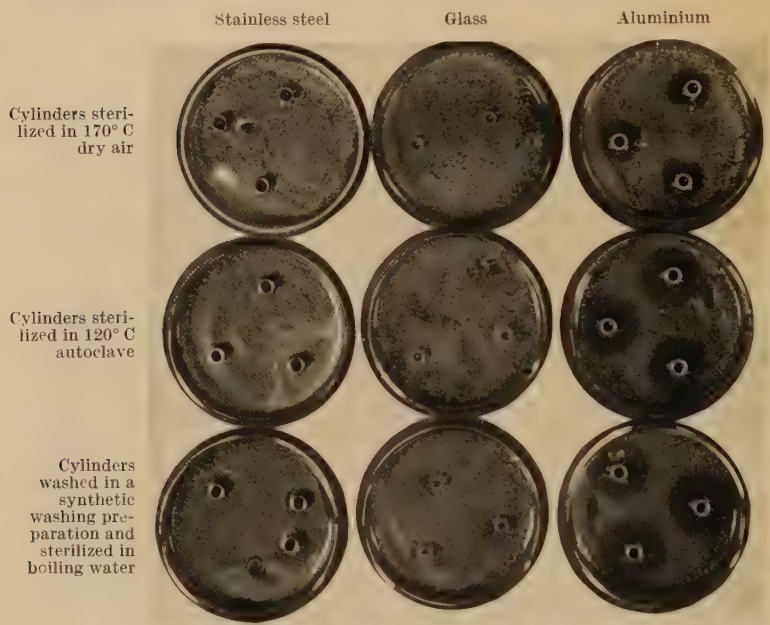


Fig. 1. Effect of different cylinders on *Staph. aureus*.

The inhibitory action from aluminium cylinders demonstrated above shows that the quality of aluminium used for these cylinders is unusable for the purpose. This must, however, not mean that all qualities of aluminium should be unusable. As mentioned above aluminium has been reported as a material used for this test. The observation however points out the necessity of extreme care when choosing materials to be used in biological tests.

Summary.

Aluminium has been reported as material for test cylinders. Our observations indicate that certain qualities of commercial aluminium tubes exert a pronounced inhibitive effect on a *Staph. aureus* culture.

Literature.

Florey, H. W.: Antibiotics. Vol. I. Oxford Medical Publications 1949. — Hirsch, A.: J. Gen. Microbiol. **4**, 70 (1950).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 111—140 (1954).

(Aus der Arbeitsgemeinschaft Chiemseemoore und Bergener Becken — Botanisches Institut der Universität Würzburg.)

Der durch Pilze und aerobe Bakterien veranlaßte Pectin- und Cellulose-Abbau im Hochmoor unter besonderer Berücksichtigung des Sphagnum-Abbaus.

Von

ELISABETH KOX.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Oktober 1953.)

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich die Forschung immer wieder mit dem im Boden stattfindenden mikrobiellen Cellulose- und Pectinabbau befaßt. Nachfolgende Arbeit soll vor allem dazu beitragen, diese Zersetzungsvorgänge im Hochmoor aufzuklären, da sie als Vorbedingung für den dort vorherrschenden *Sphagnum*-Abbau anzusehen sind.

Im Hochmoor trifft man vor allem zahlreiche *Sphagnum*-Arten an, die durch das Basenadsorptionsvermögen der Kolloide ihrer Membranen für den charakteristischen niedrigen p_H-Wert des Hochmoors mitverantwortlich sind, der daneben noch durch den hohen Kohlensäuregehalt, den sauren Charakter der gelösten Huminsäuren und durch das Vorkommen von freier Schwefelsäure verursacht wird.

Neben den *Sphagnen* sind vor allem auch die *Ericaceen* maßgebend an der Hochmoorvegetation beteiligt. Ihrer Mycorrhiza kommt eine besondere Bedeutung zu; sie wurde von der Arbeitsgemeinschaft seit 1943 einer genauen Untersuchung unterworfen, die schließlich zu der Frage führte, welche Funktionen wohl den vereinigten Symbionten, d. h. den *Ericaceen*-Pflanzen und ihren Pilzen, beim Abbau der lebenden Oberflächenschicht im Hochmoor zukommen. Dieser ist vor allem auf Pilz- und Bakterientätigkeit zurückzuführen und hat einen ständigen Zuwachs neuer Schichten im Jungtorf zur Folge.

Zur genaueren Untersuchung der einzelnen Mikroorganismen hinsichtlich ihrer Funktionen im Hochmoor wurden von Prof. BURGEFF zahlreiche Isolierungen vorgenommen und sowohl die frei vorkommenden als auch die in Symbiose lebenden Pilze sowie die vorherrschenden Bakterien in Kultur gebracht.

An Pilzen sind dabei gefunden worden: perithecienbildende *Penicillium*-Arten, nur mit Conidienträgern fruktifizierende *Penicillium*-, *Verticillium*-, *Mortierella*-Arten und schließlich Symbionten der *Ericaceen*, die mit großer Wahrscheinlichkeit, soweit bestimmbar, zur Gattung *Cladosporium* und verwandten Gattungen gehören.

Nachfolgende Arbeit soll vor allem darüber aufklären, welche Rolle eine Anzahl dieser Pilze und aeroben Bakterien, die aus den obersten Schichten eines Hochmoores isoliert worden waren, beim *Sphagnum*-Abbau spielen. Da hierbei hauptsächlich die an Pectinstoffen besonders reichen, cellulosehaltigen Zellwände der Stämmchen angegriffen und zer-

stört werden, untersuchten wir zuerst die isolierten Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit, Pectin und Cellulose abzubauen; denn dieses Vermögen dürfte wohl als Grundbedingung für einen *Sphagnum*-Abbau anzusehen sein.

I. Pectin-Abbau.

Die *Sphagnum*-Membranen sind besonders reich an Pectinstoffen, und zwar findet man in den Primärmembranen das Pectin in der Cellulose eingelagert.

Ihrer chemischen Natur nach gehören die Pectine zu den Kohlenhydraten und ergeben bei der Totalhydrolyse d-Galakturonsäure, Hexosen (insbesondere d-Galaktose), Pentosen (vor allem l-Arabinose) und Methylalkohol. Wahrscheinlich sind im Pectin-Molekül die Anhydrogalakturonsäure-Einheiten in langen geraden Ketten von hohem Molekulargewicht angeordnet und in 1,4-α-glykosidischer Bindung miteinander verbunden; ein Teil der Carboxyle ist mit Methanol verestert. Nach neueren Untersuchungen stellen l-Arabinose und d-Galaktose keine direkten Bestandteile des Pectin-Moleküls dar, sondern sind nur Begleitstoffe, die als Polysaccharide Araban und Galaktan mit den Galakturonsäureketten assoziiert sind (Bock, 1941).

Die das Pectin-Molekül zerlegenden Fermente sind als Pectinasen bekannt; nach Ehrlich besitzen vor allem 3 von ihnen eine besondere Bedeutung: Die Protopectinase (oder Pectosinase) zerlegt das in kaltem Wasser unlösliche Protopectin (das ist eine Pectin-Cellulose-Verbindung) der Mittellamellen in wasserlösliches Pectin und Cellulose; sie findet sich in den Organismen stets in Begleitung von Pectinase (Bock, 1941). Die Pectase, auch unter dem Namen Pectin-Methoxylase (Beaven u. Brown, 1949) bekannt, ist ein sehr unspezifisches Enzym. In ihrer Wirkung entspricht sie einer Esterase und wird daher auch zuweilen Pectinesterase genannt (Luh u. Phaff, 1951). Dieses Enzym spaltet beim Pectin Methylalkohol ab. Hierdurch werden die Carboxylgruppen frei und dissoziationsfähig, der p_H-Wert sinkt, es entsteht die Pectinsäure.

Das eigentliche kettenspaltende Ferment ist die Pectinase, die von einigen Autoren (Phaff, 1947; Luh u. Phaff, 1951) auch als Polygalakturonase bezeichnet wird; ihre Wirkung entspricht einer Säurehydrolyse. Sie greift die partiell veresterte Polygalakturonsäure sowie die mit ihr assoziierten Polysaccharide an, löst die glykosidischen Bindungen und zerlegt sie in Galakturonsäure bzw. in Galaktose, Arabinose usw.

Allgemein lassen sich die Enzyme, je nach den Voraussetzungen, unter denen sie gebildet werden, in konstitutive und adaptive Enzyme einteilen (Karström, 1938). Die konstitutiven Enzyme werden von dem betreffenden Organismus immer gebildet, unabhängig von der Zusammensetzung des Substrats. Allerdings kann durch die Anwesenheit des Stoffes, den das betreffende Ferment spaltet, die Produktion quantitativ wesentlich gesteigert werden. Die adaptiven Enzyme werden dagegen von dem betreffenden Organismus nur bei Bedarf gebildet, und zwar nur bei Gegenwart des zu spaltenden Stoffes.

Das historisch bekannteste Beispiel für eine Pectinzersetzung durch Mikroorganismen ist die sogenannte „Flachsröste". Hierbei sind vor allem anaerobe Bakterien tätig, daneben spielen aber auch aerobe Bakterien, wie *Bacillus mesentericus*, *Bac. subtilis* u. a., sowie auch Pilze, z. B. *Rhizopus nigricans*, eine wesentliche Rolle.

Wenn man auch eine Anzahl aerober Bakterien und Hefearten mit pectolytischer Fähigkeit kennt, so stehen doch bei der aeroben Pectinzersetzung die Pilze an erster Stelle, vor allem viele Vertreter der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* usw.

Da sich die *Sphagnum*-Membranen durch besonderen Pectinreichtum auszeichnen, stellten wir uns zunächst einmal die Aufgabe, die aus den obersten Hochmoorschichten isolierten Pilze und aeroben Bakterien nach einwandfreier Reinzüchtung auf ihre pectinzerstörende Fähigkeit zu untersuchen. Bei dieser Versuchsreihe nahmen wir die von GÄUMANN (GÄUMANN u. BÖHNI, 1946) für *Botrytis cinerea* beschriebene Methode als Unterlage; diese ließ sich sowohl bei allen Pilzen, als auch mit geringer Abänderung bei unseren aeroben Bakterien anwenden.

Bei der Pectinzersetzung in der Natur kommt der kettenspaltenden Pectinase — die bei den Pilzen stets zusammen mit Pectase vorkommt (JANSEN u. MAC DONNEL, 1945) und auch ein ständiger Begleiter der Protopectinase ist — die größte Bedeutung zu. Daher beschränkten wir uns auf die Bestimmung dieses Fermentes, das die pectinabbauenden Mikroorganismen in den meisten Fällen beim Wachsen als Exoenzym in die Nährlösung ausschieden und dann für uns nachweisbar war. Läßt man eine solche pectinasehaltige Lösung auf eine Na-pectat-Lösung einwirken, so wird nach einer gewissen Zeit die Na-pectat-Kette gespalten und die Viscosität des Reaktionsgemisches nimmt dadurch ab. Diese reduzierte Viscosität läßt sich leicht mit Hilfe eines Viscosimeters nachweisen.

In unserer Versuchsreihe verwendeten wir deshalb Na-pectat (in stets gleicher Lösung von 0,8%), weil dieses die Wirkung von Pectase blockiert und damit im Gegensatz zu reinem Pectin nur die Pectinase-Aktivität anzeigt (GÄUMANN u. BÖHNI, 1946). Auf 20 ml Na-pectat-Lösung und 5 ml n/10 Ammoniumoxalatlösung ließen wir 20 ml enzymhaltige Lösung 15 Std bei 30° C einwirken; sodann wurde von diesem Gemisch die Viscosität mit einem OSTWALDschen Viscosimeter gemessen. Diese 10 min auf 70° C erhitzte und somit inaktivierte Lösung diente ferner als Kontrollflüssigkeit I zur Bestimmung der relativen Viscositätsabnahme, die gleiche Lösung ohne Na-Pectat als Kontrollflüssigkeit II zur Bestimmung der spezifischen Viscosität. — Beide Vergleichslösungen wurden ebenfalls 15 Std bei 30° C gehalten.

a) Pectin-Abbau durch Pilze.

Nach dieser eben beschriebenen Methode wurden zunächst folgende 20, von Prof. BURGEFF isolierten und bestimmten Pilze auf Pectinasebildung vergleichend untersucht. Zum großen Teil gehören sie der Gattung „*Cladosporium*" oder verwandten Gattungen an und leben im Hochmoor mit *Ericaceen* in Symbiose.

1. Symbionten:	*Rh 31 (Sym)*	*461 (Sym)*	*4719 (Sym)*	*5010 (Sym)*
	Rh 53 „	*464* „	*484a* „	*5014* „
	4318b „	*478* „	*488b* „	*5021* „
	4318c „	*4714* „	*491* „	
2. Mortierellen:	*4355 (M)* und	*4631 (M)*		
3. Penicillien:	*501 (P)*			
4. Verticillien:	*482 (V)* und	*5040 (V).*		

Es sei an dieser Stelle schon vorweggenommen, daß den *Mortierellen* in unserer Arbeit wenig Bedeutung zukommt, denn sie zeigten bei allen Untersuchungen keinerlei Abbaufähigkeit.

Von diesen 20 untersuchten Pilzen zeigten 9 eine deutliche Pectinasewirkung; sie seien nach abnehmender Intensität angeordnet: *501 (P)* → *482 (V)* → *464 (Sym)* → *5040 (V)* → *5021 (Sym)* → *484a (Sym)* →

5010 (Sym) → *RH 53 (Sym)* → *478 (Sym)*. Abb. 1 gibt die verschieden starke pectolytische Fähigkeit dieser Pilze nach 4, 7 und 11 Tagen Wachstum in der Nährlösung an; aus diesen Ergebnissen lassen sich Rückschlüsse auf die Geschwindigkeit und Stärke des Pectin-Abbaus im Moor durch diese Mikroorganismen ziehen.

Alle Versuche mit den in Abb. 1 dargestellten Ergebnissen wurden mit einer Czapek-Dox-Lösung[1] angesetzt, die noch zusätzlich 0,05% Na-pectat enthielt. Aber auch in pectatfreier Nährlösung produzierten alle diese Pilze Pectinase, allerdings in wesentlich geringerer Menge, so daß die von unseren Hochmoorpilzen gebildete Pectinase als konstitutives Enzym anzusehen ist.

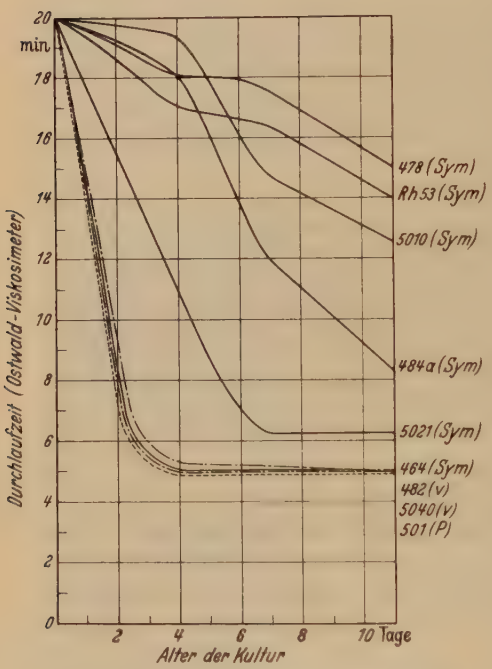


Abb. 1. Abnahme der Viscosität durch pectinabbauende Pilze. —— *Symbionten.* ---- *Penicillien.* ·-·-· *Verticillien.* Ausgangsdurchlaufszeit der Kontrollflüssigkeit I: 20′. Durchlaufszeit der Kontrollflüssigkeit II: 4′ 33—35″.

b) Pectin-Abbau durch aerobe Bakterien.

Die aeroben Bakterien stammten ebenfalls aus den obersten Hochmoorschichten und wurden als — durch zahlreiche aufeinanderfolgende Verdünnungskulturen gewonnene — Reinkulturen untersucht. Von den vielen isolierten Bakterienstämmen wählten wir 5 für unsere Versuche aus. Auf ihre systematische Zugehörigkeit wird eine spätere Veröffentlichung hinweisen.

Ihre Prüfung auf pectinabbauende Fähigkeiten erfolgte nach der gleichen, schon beschriebenen Methode (Gäumann u. Böhni, 1946), nur mußte, um überhaupt ein Bakterienwachstum zu erreichen, der pectathaltigen Czapek-Dox-Lösung noch 5% Pepton zugesetzt werden; die fertige Nährlösung besaß einen pH-Wert von 5,6. Eine zusätzliche Filtration durch ein Bakterienfilter lieferte klare Enzymlösungen, die wir erst in diesem Zustand mit Na-pectat-Lösung zusammenbringen und für die Viscosimeterversuche verwenden konnten.

Alle Versuche, sowohl mit einzelnen Bakterien, als auch jene, bei denen die Bakterien in ihrer Gesamtheit geprüft wurden, verliefen vollkommen negativ.

[1] Czapek-Dox-Lösung: $NaNO_3$ 3,0 g; KH_2PO_4 1,0 g; $MgSO_4$ 0,5 g; KCl 0,5 g; $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,01 g; Glucose 10,00 g; dest. H_2O 1000,00 g.

Nach diesem Ergebnis sollte zunächst mit Hilfe eines bekannten pectolytischen Bakteriums festgestellt werden, ob sich diese von GÄUMANN für Pilze angegebene Methode auch zur Untersuchung von Bakterien anwenden läßt. Dazu verwendeten wir die aus geröstetem Flachs unter aeroben Bedingungen isolierten Bakterien und verfuhren damit nach der beschriebenen Methode. Schon nach einigen Tagen, als die Bakterien sehr stark in der Nährlösung gewachsen waren, ergab sich, daß die „GÄUMANN-Methode" tatsächlich auch zum Pectinasenachweis bei Bakterien brauchbar ist:

Viscositätsabnahme durch Flachsbakterien.

Alter der Kultur in Tagen	Kontr. Flüssigkeit I Durchlaufzeit bei 20° C	Enzymhaltige Lösung Durchlaufzeit bei 20° C
4	21 min 30 sec	5 min 25 sec

Nun wurde der gleiche Versuch nochmals mit unseren Hochmoorbakterien wiederholt unter Anwendung einer anderen Nährlösung[1], in der die Bakterien wesentlich besseres Wachstum zeigten. Um festzustellen, ob in dieser Lösung überhaupt durch irgendein Bakterium eine Pectinaseproduktion erfolgt, wurden zunächst alle Bakterien zusammen in die Nährlösung geimpft und in ihrer Gesamtheit nach 10, 20, 30 und 40 Tagen Wachstum (bei 30° C) untersucht. Unter diesen neu gewählten Bedingungen waren die Bakterien sehr stark gewachsen und erwiesen sich nun doch als pectinasebildende Mikroorganismen; vermutlich ist für diese Fähigkeit gutes Wachstum Voraussetzung, oder es sind sonstige bestimmte Bedingungen — die jetzt gegeben waren — hierfür erforderlich.

Zu ähnlichen Schlußfolgerungen war auch schon FERNANDO (1939) bei seinem Versuch mit *Bac. carotovorus* gelangt; er schreibt: „Eine kräftige Enzymausscheidung durch *Bac. carotovorus* ist gewährleistet, wenn gutes Wachstum erfolgt .... Von besonderer Bedeutung ist das anfängliche C:N-Verhältnis des Kulturmediums, da dieses die H-Ionenkonzentration stark beeinflußt."

Abnahme der Viscosität, verursacht durch alle Bakterien zusammen.

Alter der Kultur in Tagen	Kontr. Flüssigkeit I Durchlaufzeit bei 20° C	Enzymhaltige Lösung Durchlaufzeit bei 20° C	Kontr. Flüssigkeit II Durchlaufzeit bei 20° C
10	22 min 00 sec	22 min 00 sec	
20	22 min 00 sec	12 min 39 sec	
30	22 min 00 sec	8 min 53 sec	
40	22 min 00 sec	7 min 42 sec	4 min 36 sec

Nachdem sich so die Hochmoorbakterien in ihrer Gesamtheit als Pectinasebildner erwiesen hatten, sollten nun noch die gleichen Bakterien einzeln geprüft werden. Um gleiche Voraussetzungen zu schaffen, wurde von einem Bakterium soviel in die Nährlösung geimpft, daß dies der vor-

[1] KH_2PO_4 0,25 g; K_2HPO_4 0,25 g; $MgSO_4$ 0,25 g; $(NH_4)_2SO_4$ 0,25 g; $NaNO_3$ 1,50 g; $FeSO_4$ 0,02 g; Glucose 5,00 g; Pepton 5,00 g; Na-Pectat 1,00 g; dest. H_2O 1000,00 g; p_H 6,1 E (E = p_H elektrometrisch bestimmt).

her geimpften Menge aller Bakterien zusammen gleichkam. Nach 40 Tagen wurde diese Lösung, in der die Bakterien sehr stark gewachsen waren, auf Pectinase geprüft. Hierbei kamen wir bei unseren 5 Bakterienstämmen in Reinkultur zu dem Ergebnis, daß nur bei einem Vertreter, der als *15d* gekennzeichnet war, eine sehr starke Pectinaseproduktion stattgefunden hatte, während alle übrigen Bakterien nicht die geringste Fähigkeit besaßen, Pectinase in die Nährlösung auszuscheiden. Der Bakterienstamm *15d* zeigte auch sonst ein abweichendes Verhalten gegenüber den anderen Reinkulturen; seine kokkoiden Stäbchen gaben eine positive Gram-Färbung, während die anderen Kurzstäbchen gramnegativ waren.

Abnahme der Viscosität durch 15d.

Alter der Kultur in Tagen	Kontr. Flüssigkeit I Durchlaufzeit bei 20° C	Enzymhalt. Lösung Durchlaufzeit bei 20° C	Enzymhalt. Lösung bei pekt. freier Nlg. Durchlaufz. bei 20° C	Kontr. Flüssigkeit II Durchlaufzeit bei 20° C
40	22 min 00 sec	5 min 03 sec	15 min 25 sec	4 min 36 sec

Da *15d* auch in einer pectinfreien Lösung Pectinase erzeugt hatte — allerdings in geringerer Menge —, war damit der Beweis erbracht, daß wir es in diesem Falle wieder mit einem konstitutiven Enzym zu tun hatten.

II. Cellulose-Abbau.

Die *Sphagnum*-Pflanzen besitzen neben dem charakteristischen hohen Pectingehalt auch eine sehr beträchtliche Menge an Cellulose (nach Plank, 1946, etwa 43% des lufttrockenen Materials). Wenn auch die Cellulose niedriger Pflanzen nicht vom gleichen Typ ist wie die der höheren Pflanzen, so ergeben doch die *Sphagnum*-Membranen — nach den üblichen Vorbehandlungen — die gleichen Cellulose-Farbreaktionen, welche auch für höhere Pflanzen bekannt sind.

Allerdings weist die Struktur der *Sphagnum*-Cellulose einige Abweichungen von der gewöhnlichen Cellulose auf; sie besitzt z. B. eine wesentlich kürzere Kettenlänge. Ferner nimmt Plank (1946) an, daß die Cellulose der *Sphagnen* einen großen Anteil an anderen Zucker-Polymeren, z. B. Xylane, außerdem Oxydationsprodukte, wie Oxycellulose, besitzt und nur zu 3,8% aus Glucosanen besteht, die durch 1,4-β-glucosidische Bindung miteinander verknüpft sind.

Aber auch die Cellulose höherer Pflanzen stellt keinen homogenen Körper dar, vielmehr bestehen hier die Membranen aus einem Gemisch von reiner Cellulose, Oxy- und Hemicellulose, deren Resistenz gegen Hydrolyse und Oxydation auch in dieser Reihenfolge abnimmt (Daszewska, 1911/12).

Die chemische Struktur der reinen Cellulose ergibt sich aus ihrer Hydrolyse mit wäßrigen Mineralsäuren, bei der sie vollständig in Glucose gespalten wird. Somit besteht das Cellulose-Molekül aus langen Ketten, in denen zahlreiche Glucose-Moleküle in 1,4-β-glucosidischer Bindung verknüpft sind.

Die Cellulosezerstörung durch Pilze und Bakterien kann auf sehr verschiedene Weise vor sich gehen. Grundsätzlich muß man hier einen anaeroben und einen aeroben Abbau unterscheiden. In unserem Falle ist nur der aerobe Abbau

von Interesse, der in der Natur eine ganz bedeutende Rolle spielt. An diesem Prozeß sind neben aeroben Bakterien vor allem die Pilze beteiligt, die mittels Fermenten die Zerstörung durchführen. Nach Angaben von Pringsheim (1912) kann man annehmen, daß bei der Cellulosezersetzung 2 Fermente zusammenwirken, welche die β-glucosidischen Bindungen zu spalten vermögen. Durch den aufeinanderfolgenden Angriff von Cellulase und Cellobiase führt die Hydrolyse über das Disaccharid Cellobiose bis zur d-Glucose.

Andere Autoren bezeichnen die Cellulosezerstörung als einen oxydativen Abbau, bei dem nach Winogradsky (1949) Oxycellulose als Abbauprodukt entstehen soll, während Fåhraeus (1944) beweisen konnte, daß solche Stoffe erst durch sekundären Aufbau aus niederen Gliedern entstehen.

Zahlreiche Arbeiten sind bereits über die celluloseabbauende Eigenschaft aerober Mikroorganismen veröffentlicht worden.

So berichtet z. B. Winogradsky (1949) von den 3 Gattungen *Cytophaga*, *Cellvibrio* und *Cellfalcicula*, die neben vielen anderen aeroben Bakterien als Cellulosezerstörer bekannt sind.

Von den Pilzen wurde noch eine weitaus größere Anzahl als cellulosezersetzende Mikroorganismen beschrieben, so daß die Aufzählung auch nur der bekanntesten zu weit führen würde. Daher sei nur erwähnt, daß insbesondere die Schimmelpilz-Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Trichoderma* neben vielen anderen *Ascomyceten*, sowie zahlreichen Vertretern anderer Klassen, als Cellulosezerstörer im Boden eine bedeutende Rolle spielen. (Vgl. z. B. Daszewska, 1911/12; Löhnis, 1935; Reese u. Levinson, 1952 u. a.)

Bei der Untersuchung unserer Mikroorganismen in vitro auf ihre celluloseabbauende Fähigkeit war es von besonderer Wichtigkeit, einige wesentliche natürliche Bedingungen zu berücksichtigen. Die größte Schwierigkeit bedeutete hier, eine geeignete Cellulose als Substrat zu verwenden, die der natürlichen annähernd gleichkam, zumal schon die Cellulosearten verschiedener Herkunft nicht miteinander identisch sind und auch in den Pflanzenmembranen stets nur ein Gemisch von reiner Cellulose mit Hemi-, Oxycellulosen und Pentosanen zugegen ist. Ein ähnliches inhomogenes Substrat stand uns aber nicht für unsere Versuche zur Verfügung. Aus diesem Grunde verwendeten wir verschiedenes Material, für die eine Versuchsserie reine Cellulose, und daneben für den Parallelversuch Filtrierpapier Nr. 597 von Schleicher und Schüll. Letzteres stellte zwar keine reine 100%ige Cellulose dar, weil bei der Gewinnung, Reinigung und Herstellung infolge des Zusammenwirkens chemischer und physikalischer Faktoren leicht Derivate wie Oxy-, Hydro- und Hydratcellulose entstehen (Daszewska, 1911/12; Holländer, 1932; Winogradsky, 1949); aber diese Verunreinigungen sind uns ja gerade erwünscht, denn sie spielen auch in der Natur als ständige Begleiter der reinen Cellulose eine Rolle.

Ebenso kommt der Zusammensetzung der Nährlösung eine besondere Bedeutung zu, vor allem ihrem N-Gehalt, denn der Grad des Celluloseabbaus ist von der Menge des assimilierbaren Stickstoffs abhängig, wie schon Waksman an Hand cellulosezersetzender Pilze nachweisen konnte (Holländer, 1932).

a) Celluloseabbau durch Pilze.

Es wurden wieder die gleichen 20, bereits im vorigen Kapitel aufgezählten Pilze untersucht, und zwar bei 2 Versuchsreihen in einem jeweils grundsätzlich verschiedenen Kulturmilieu. Bei den ersten Versuchen ließen wir die Mikroorganismen in einer künstlichen Nährlösung auf Cel-

lulose einwirken, ein andermal versuchten wir, den natürlichen Bedingungen im Hochmoor etwas näher zu kommen und benutzten daher als Nährboden nur feuchtes *Sphagnum* zusammen mit Filtrierpapier.

Bei Verwendung einer Mineralsalzlösung wurde zunächst der Boden von 100 cm^3-Erlenmeyer-Kölbchen mit gut ausgekochtem, grobem Bimssteinkies bedeckt, etwa 50 ml Nährlösung dazugegeben und ein gewogener, gefalteter Cellulose- bzw. Filtrierpapierstreifen (3,5 × 12 cm) aufrecht — vom Bimskies gehalten — hineingestellt; die obere Hälfte ragte dabei noch aus der Flüssigkeit heraus. Die Pilze wurden in die Nährlösung und auf den herausragenden Celluloseteil geimpft, so daß sie genügend Luftzutritt hatten. Alle Pilzkulturen überließen wir bei Zimmertemperatur dem Wachstum.

1. Abbau von reiner Cellulose.

1*a*) Zuerst diente den Pilzen eine Eg_1-Lösung[1] zusammen mit reiner Cellulose als Substrat. Die Pilze wuchsen darauf zum größten Teil sehr schwach. Nur eine *Penicillium*-Art (*501*) hatte die Cellulose innerhalb von 3 Monaten vollkommen aufgelöst, in den übrigen Kulturen machte sie einen völlig unveränderten Eindruck, was dann auch noch durch mikroskopische Untersuchungen und quantitative Cellulosebestimmungen bestätigt wurde.

Methode: Die mit Pilz bewachsene Cellulose setzt dem Auflösen oft großen Widerstand entgegen. Daher ist es von Vorteil, wenn man sie zuerst nacheinander in 1¼%iger Kalilauge und 1¼%iger Schwefelsäure kocht und dann erst vollkommen in Schweizers Reagens auflöst. [Man rechnet auf 1 Grundmol Cellulose = 162 g minimal 1 Mol Kupfer. In der Praxis nimmt man aber meistens die 4fache Menge an $Cu(OH)_2$.] Zur Herstellung einer sogenannten Cellulose-Kupferoxamlösung löst man 1 g Cellulose mit 2,4 g $Cu(OH)_2$ in 200 ml 20%igem Ammoniak durch kräftiges Schütteln auf. Nach Filtration der Lösung dieses Cellulose-Kupfer-Komplexes läßt sich sodann aus dem Filtrat die Cellulose mit Salzsäure wieder ausfällen. Diese wird in einem gewogenen Filter gesammelt, gründlich ausgewaschen und nach mehrstündigem Trocknen bei 90° bis zur Gewichtskonstanz gewogen. Die Differenz zwischen dargebotener und übriggebliebener Cellulose ergibt die Menge der vom Pilz abgebauten Cellulose. (Diese Methode wurde teilweise der Arbeit von Holländer, 1932, entnommen.)

1 b) Wie schon oben erwähnt, zeigten die Pilze in der zuerst gebotenen Eg_1-Lösung sehr spärliches Wachstum. Deshalb wurde die zweite Versuchsreihe mit einer abgeänderten Czapek-Dox-Lösung[2], in welcher die Pilze bei Vorversuchen sehr gut gewachsen waren, wieder zusammen mit reiner Cellulose angesetzt. Neben unseren 20 Hochmoorpilzen wurden diesmal noch die als Cellulosezerstörer bekannten Pilze *Chaetomium* (= *7215*) und *Stysanus stemonites* (= *7112*) unter denselben Bedingungen zum Vergleich mitangesetzt.

[1] KH_2PO_4 0,25 g; K_2HPO_4 0,25 g; $MgSO_4$ 0,25 g; $FeSO_4$ 0,02 g; $Ca(NO_3)_2$ 1,00 g; $(NH_4)_2SO_4$ 0,25 g; dest. H_2O 1000,00 g; p_H 5,8 E.

[2] $NaNO_3$ 1,50 g; $(NH_4)_2SO_4$ 0,75 g; KH_2PO_4 1,00 g; $MgSO_4$ 0,50 g; KCl 0,50 g; $FeSO_4$ 0,01 g; Pepton 5,00 g; dest. H_2O 1000,00 g; p_H 5,9 E.

Wie zu erwarten war, zeigten die Pilze in der neu gewählten Nährlösung ein auffallend kräftiges Wachstum; die Cellulose schien bei diesem Versuch neben *501* (*P*) und den beiden Vergleichspilzen auch noch von einigen anderen Pilzen angegriffen zu sein. Da mikroskopisch bei den Kulturen, die eine Celluloseveränderung vermuten ließen, nur eine sehr schwache Zerstörung festzustellen war — außer bei *501* (*P*) und den Vergleichspilzen färbten sich die Fasern mit Chlorzinkjod bei allen anderen noch kräftig violett —, wurde bei folgenden Pilzkulturen eine quantitative Cellulosebestimmung durchgeführt: *7215*, *7112*, *501* (*P*), *464* (*Sym*), *461* (*Sym*), *5040* (*V*), *488b* (*Sym*), *5010* (*Sym*), *5021* (*Sym*) und *482* (*V*).

Sie erbrachte den Beweis, daß die Cellulose nicht nur durch *501* (*P*) vollkommen, sowie durch *Chaetomium* und *Stysanus stemonites* zum größten Teil zerstört worden war, sondern auch durch einige andere Pilze einen geringen Abbau erlitten hatte. Folgende Tabelle gibt den durch die Pilze nach ungefähr 4 Monaten verursachten Celluloseverlust in Prozenten wieder:

Pilz	*501* (*P*)	*7215*	*7112*	*464* (*Sym*)	*461* (*Sym*)	*5040* (*V*)	*488b* (*Sym*)
Verlust der ursprünglichen Cellulose in %	100,00	51,97	36,32	12,32	5,51	3,45	3,09

2. Abbau von Filtrierpapier.

Bei den folgenden Versuchen wurde den Pilzen Filtrierpapier Nr. 597 von Schleicher u. Schüll als Cellulosequelle geboten, und zwar parallel laufend in 2 verschiedenen Nährlösungen, die wir einfachheitshalber mit a und b bezeichnen wollen[1]. Lösung a stellte eine von Omelianski beschriebene, besonders nährstoffarme Lösung dar, die absichtlich gewählt wurde, um dadurch die Mikroorganismen zu zwingen, die Cellulose mit als Nährstoffquelle zu verwerten.

Schon nach 14 Tagen konnte man deutlich sowohl bei a als auch b erkennen, daß den Mikroorganismen das Filtrierpapier entschieden mehr zusagte, als die zuvor gebotene reine Cellulose; die meisten Pilze hatten den aus der Lösung herausragenden Teil des Filtrierpapiers schon nach dieser kurzen Zeit stark überwachsen.

Nach einem Pilzwachstum von etwa $3\frac{1}{2}$ Monaten wurden alle Kulturen auf den Grad ihrer Cellulosezerstörung vergleichend untersucht. Schon rein äußerlich fiel sofort ins Auge, daß in der schwächeren Nährlösung a eine ungleich stärkere Cellulosezersetzung stattgefunden hatte.

[1] Lösung a: KH_2PO_4 1,00 g; NH_4NO_3 1,00 g; $NaNO_3$ 0,50 g; NaCl 0,05 g; dest. H_2O 1000,00 g; p_H 5,7 E.

Lösung b war die oben (S. 118, Anm. 2) angegebene, abgeänderte Czapek-Dox-Lösung, die im Vergleich zu Lösung a einen viel höheren Nährstoffgehalt besitzt.

Hier waren die Pilze fast nur auf dem herausragenden Teil des Filtrierpapiers gewachsen, hatten diesen mit einer dicken Mycelschicht überzogen und in vielen Fällen auch zersetzt. Die Kulturen b zeigten dagegen wesentlich kräftigeres Pilzwachstum, das allerdings zum größten Teil auf der gehaltreichen Nährlösung stattgefunden hatte, die anscheinend den Nährstoffbedarf der Mikroorganismen fast vollkommen zu decken vermochte, so daß die Cellulose meist nur schwach angegriffen worden war.

Der Zersetzungsgrad der Cellulose ließ sich leicht durch mikroskopische Untersuchung des bewachsenen Filtrierpapiers feststellen. Bei totalem Abbau konnte man überhaupt keine Faserfragmente mehr neben dem Hyphengeflecht erkennen; bei nicht ganz so starker Zerstörung waren stellenweise nur noch wenige kleinste Bruchstücke von den langen Cellulosefasern übrig geblieben. Die Membranoberfläche der Fasern war durch die Zersetzung rillig geworden; schließlich verblieben in vielen Fällen nur noch kleine, aus lockeren Fibrillenbündeln bestehende Stückchen (vgl. Abb. 2c).

Mit Chlorzinkjod fand bei vollständiger Zerstörung überhaupt keine Färbung mehr statt, bei starkem Abbau färbten sich die Fibrillen der winzigen Faserfragmente rot und bei schwacher Zersetzung zeigten die Bruchstücke der Cellulosefasern rotviolette Farbe.

Diese mikroskopischen Untersuchungen zusammen mit den charakteristischen Chlorzinkjod-Färbungen gaben uns die Möglichkeit, die cellulosezerstörenden Pilze nach ihrer Abbaustärke einzuteilen. Neben den beiden Vergleichspilzen zeigten von den 20 untersuchten Hochmoorpilzen in Lösung a 12 die Fähigkeit, Cellulose mehr oder weniger stark abzubauen; nach abnehmender Zerstörungskraft ergeben sie folgende Reihenfolge: *461* (*Sym*)/*a* → *501* (*P*)/*a* → *7215*/*a* → *478* (*Sym*)/*a* → *464* (*Sym*)/*a* → *482* (*V*)/*a* → *488b* (*Sym*)/*a* → *5040* (*V*)/*a* → *5014* (*Sym*)/*a* → *491* (*Sym*)/*a* → *7112*/*a* → *4318c* (*Sym*)/*a* → *4318b* (*Sym*)/*a* → *Rh 53* (*Sym*)/*a*.

Die Pilze *461* (*Sym*), *501* (*P*) und *7215* hatten die Cellulose vollkommen aufgelöst (auch keine Färbung mehr mit Chlorzinkjod). Den Abbau bei *478* (*Sym*), *464* (*Sym*) und *482* (*V*) könnte man auch noch als fast total bezeichnen, denn es waren nur noch ganz vereinzelt winzige Faserbruchstücke im Mikroskop zu finden.

Wie schon erwähnt, zeigten die Kulturen mit Lösung b einen bedeutend schwächeren Celluloseabbau, so daß von den 20 untersuchten Pilzen außer den beiden Vergleichspilzen nur 5 zerstörende Fähigkeit besaßen; sie wurden wieder nach abnehmender Stärke geordnet: *7112*/*b* → *501* (*P*)/*b* → *7215*/*b* → *478* (*Sym*)/*b* → *464* (*Sym*)/*b* → *5040* (*V*)/*b* → *482* (*V*)/*b*. Totale Zersetzung der Cellulose war hier nur durch *7112* und *501* (*P*) erfolgt.

Zum Schluß wurde die Abbaustärke der Cellulosezersetzer beider Lösungen noch einmal miteinander verglichen. Nachfolgende Übersicht bringt die Reihenfolge nach abnehmendem Zersetzungsgrad: *461 (Sym)/a → 501 (P)/a → 7112/b → 7215/a → 501 (P)/b → 478 (Sym)/a → 464 (Sym)/a → 482 (V)/a → 7215/b → 488b (Sym)/a → 5040 (V)/a → 5014 (Sym)/a → 491 (Sym)/a → 478 (Sym)/b → 464 (Sym)/b → 5040 (V)/b → 482 (V)/b → 7112/a → 4318c (Sym)/a → 4318b (Sym)/a → Rh 53 (Sym)/a.*

p_H-Messungen der Kulturlösungen a und b: Alle Messungen wurden elektrometrisch durchgeführt (*O/a* und *O/b* = sterile Vergleichskulturen von Lösung a und b):

O/a, 5010 (Sym)/a, 484a (Sym)/a, 5021 (Sym)/a und *464 (Sym)/a* ergaben sämtlich den Wert 5,7. Bei b waren die Werte: *O/b*: p_H 5,9; *5010 (Sym)/b*: p_H 6,7; *478 (Sym)/b*: p_H 6,7; *4631 (M)/b*: p_H 6,6 und *482 (V)/b*: p_H 6,5.

Die konstante Erhöhung des p_H-Wertes bei den Kulturen b wurde nicht etwa, wie man vermuten könnte, von den Cellulose-Abbauprodukten verursacht, sondern sicher allein durch das kräftige Pilzwachstum (Absterben von eiweißhaltigem Mycel usw.) bedingt. Dies beweist allein schon die Tatsache, daß neben den Cellulosezerstörern auch *5010 (Sym)/b* den p_H-Wert von 5,9 auf 6,7 erhöht hatte. Dieser Pilz besaß in diesem Milieu nicht die geringste cellulosezerstörende Fähigkeit, war aber sehr stark gewachsen.

Dagegen war der p_H-Wert der Kulturen a, in denen ein kräftiger Celluloseabbau erfolgt war, völlig konstant geblieben; hier hatte nur sehr spärliches Pilzwachstum stattgefunden.

3. Künstlicher Celluloseabbau unter Nachahmung natürlicher Bedingungen.

Auf Grund der Annahme, daß vielleicht ein Vergleich der Pilzleistung auf natürlichem Substrat besser der Wirklichkeit entsprechen und damit mehr Bedeutung besitzen könnte, ersetzten wir bei unserer neuen Versuchsreihe die synthetische Nährlösung durch feuchtes *Sphagnum*.

Die nährstoffreichen *Sproß*gipfel wurden vom Moos entfernt und mit dem übrigen, völlig grünen Material 100 cm^3 Erlenmeyer-Kölbchen knapp bis zur Hälfte gefüllt. Nach gründlicher Durchfeuchtung der *Sphagnum*-Grundlage mit Wasser legten wir auf die geebnete Oberfläche ein kleines Filtrierpapierstreifchen (Größe: 2,3 × 3,3 cm), das beim Sterilisationsprozeß mit der dabei entstandenen *Sphagnumlösung* — die man einer sehr schwachen Nährlösung von p_H 4,3 gleichstellen kann — getränkt wurde. Sodann beimpften wir 2 Ränder des feuchten Papierstreifens mit dem entsprechenden Pilz, so daß das Impfstück halb auf dem Filtrierpapier und halb auf dem Moos zu liegen kam und sich der Pilz in beliebiger Richtung ausbreiten konnte.

Schon nach kurzer Zeit konnten wir die auffällige Beobachtung machen, daß sich bei den meisten Kulturen der Pilz nur auf dem

Filtrierpapier ausgebreitet und hier ein kräftiges Wachstum entwickelt hatte. Auch nach 4 Monaten hatte sich dieses charakteristische Aussehen nicht verändert. Die meisten Pilze waren nur auf dem Filtrierpapier gewachsen, hatten dieses mit einer dicken Mycelschicht überzogen und dadurch dessen Form deutlich von dem benachbarten *Sphagnum* abgegrenzt. Dieses Verhalten schien anzuzeigen, daß die Pilze die dargebotene Cellulose noch zusätzlich als Nährstoffquelle benötigten.

Von unseren Hochmoorpilzen hatten *4318c* (*Sym*), *461* (*Sym*), *464* (*Sym*), *478* (*Sym*), *4714* (*Sym*), *501* (*P*) und *5010* (*Sym*) nur das Filtrierpapier bewachsen und dieses mit einer dicken Mycelschicht vollkommen überzogen; *4318b* (*Sym*) und *5014* (*Sym*) waren noch ganz schwach auf das benachbarte *Sphagnum* übergewachsen.

Die Pilze *488b* (*Sym*) und *491* (*Sym*) zeigten zwar auch ein auf dem Papierstreifen beschränktes, jedoch nur sehr spärliches Wachstum. Bei *4719* (*Sym*) ließ sich überhaupt kein Pilzwachstum feststellen, doch hatten sich von den beiden Impfstellen ausgehend auf dem Filtrierpapier große, gelbbraun gefärbte Höfe gebildet, die etwa die Hälfte des Papierstreifens ausmachten; dieser machte schon rein äußerlich betrachtet einen angegriffenen Eindruck.

Dagegen hatten *4355* (*M*), *482* (*V*) und *5040* (*V*) die gesamte Oberfläche stark, *Rh 53* (*Sym*) allerdings nur spärlich, überwachsen, während sich *4631* (*M*) nur auf dem *Sphagnum* entwickelte.

Den beiden Vergleichspilzen, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert worden waren, sagte anscheinend das gebotene Milieu überhaupt nicht zu; sie gehörten ja auch nicht den isolierten Hochmoorpilzen an. *7215* (*Chaetomium*) zeigte ganz spärliches Wachstum auf der gesamten Oberfläche, während *7112* (*Stysanus stemonites*) sich überhaupt nicht entwickelt hatte. Beide Pilze, die sonst als starke Cellulosezerstörer bekannt sind, vermochten unter den gebotenen Bedingungen die Cellulose überhaupt nicht anzugreifen.

Unsere Hochmoorpilze (bei diesen *Sphagnum*-Kulturen mit *s* bezeichnet) zeigten dagegen unter den neu gewählten, der Natur weitgehendst angepaßten Verhältnissen zum großen Teil eine stark ausgeprägte cellulosezersetzende Fähigkeit. So konnten wir diesmal von den 20 untersuchten Pilzen 15 als Cellulosezerstörer bezeichnen; sie werden nachfolgend mit abnehmender Zersetzungskraft angegeben: *461* (*Sym*)/*s* → *478* (*Sym*)/*s* → *482* (*V*)/*s* → *501* (*P*)/*s* → *5040* (*V*)/*s* → *5010* (*Sym*)/*s* → *464* (*Sym*)/*s* → *4714* (*Sym*)/*s* → *4318c* (*Sym*)/*s* → *4719* (*Sym*)/*s* → *5014* (*Sym*)/*s* → *4318b* (*Sym*)/*s* → *491* (*Sym*)/*s* → *488b* (*Sym*)/*s* → *Rh 53* (*Sym*)/*s*.

Da der Abbau bei den einzelnen Pilzen sehr verschiedenartig stattfand — die einen hatten das ganze Filtrierpapier gleichmäßig stark abgebaut, während andere nur bestimmte Stellen angriffen und den Rest

unverändert ließen —, seien darum diese 2 Gruppen nochmals getrennt nach ihrer Abbaustärke geordnet.

Folgende Pilze zerstörten das Filtrierpapier einheitlich stark: *461 (Sym)/s → 478 (Sym)/s → 482 (V)/s → 501 (P)/s → 5040 (V)/s → 5010 (Sym)/s → 464 (Sym)/s → 5014 (Sym)/s*. Nur bestimmte Stellen wurden von folgenden Pilzen zersetzt: *4714 (Sym)/s → 4318c (Sym)/s → 4719 (Sym)/s → 491 (Sym)/s → 4318b (Sym)/s → 488b (Sym)/s → Rh 53 (Sym)/s*. Abb. 2 gibt das mikroskopische Bild zerstörter Cellulosefasern wieder.

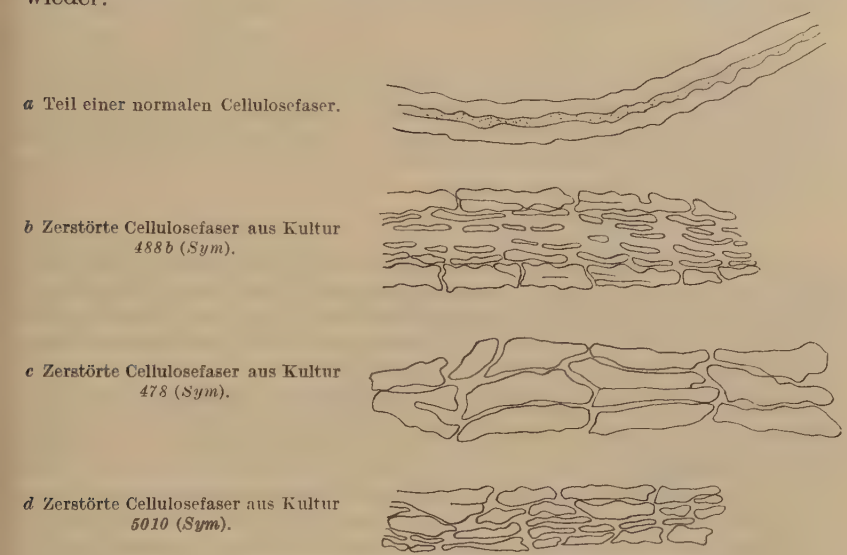


Abb. 2. Zerstörung der Cellulosefaser durch Pilze.

Den Abschluß dieser Untersuchungen bildete ein Vergleich der Abbaustärke, welche die Pilze einmal in der synthetischen Nährlösung a und zum anderen unter Verwendung eines der Natur angepaßten Substrats gezeigt hatten:

Unter naturähnlichen Verhältnissen besaß nicht nur eine größere Anzahl von Pilzen cellulosezerstörende Fähigkeiten, die meisten Mikroorganismen verursachten auch einen weitaus stärkeren Zersetzungsgrad; dies war z. B. bei folgenden der Fall: *478 (Sym)/s, 482 (V)/s, 5040 (V)/s, 4318c (Sym)/s, 4719 (Sym)/s, 5014 (Sym)/s, 4318b (Sym)/s*.

5010 (Sym)/s, 4714 (Sym)/s und *4719 (Sym)/s* erwiesen sich überhaupt nur unter diesen Bedingungen als Cellulosezerstörer und hatten in der Nährlösung die Cellulose gar nicht angegriffen.

Bei *461 (Sym)/s, 464 (Sym)/s* und *Rh 53 (Sym)/s* war eine Zerstörung von gleicher Stärke erfolgt, während die Pilze *501 (P)/s, 491 (Sym)/s*

und *488b* (*Sym*)/*s* in *Sphagnum*-Kultur das Filtrierpapier etwas schwächer zersetzt hatten.

Die elektrometrischen p_H-Messungen bei den 4 Monate alten Kulturen führten wieder zu dem gleichen Ergebnis, wie es schon bei den Nährlösungsversuchen geschildert wurde: In allen pilzbewachsenen Kulturen war ein p_H-Anstieg erfolgt, ganz gleich, ob es sich um Cellulosezersetzer handelte oder nicht: *0/s*: p_H 4,3; *7112/s*: p_H 4,3 (keinPilzwachstum); *464* (*Sym*)/*s*: p_H 4,9 (Pilzwachstum); *484a* (*Sym*)/*s*: p_H 4,9 (Pilzwachstum); *5010* (*Sym*)/*s*: p_H 4,9 (Pilzwachstum); *Rh 53* (*Sym*)/*s*: p_H 4,9 (Pilzwachstum).

b) Celluloseabbau durch aerobe Bakterien.

Zur Untersuchung der aeroben Hochmoorbakterien auf ihre cellulosezersetzende Fähigkeit ließen wir sie einerseits in verschiedenen Nährlösungen auf reine Cellulose und parallel dazu auf Filtrierpapier einwirken; andererseits wurden sie auf Celluloseagar kultiviert. Wieder wurden unsere 5 Bakterien-Reinkulturen einzeln und in ihrer Gesamtheit untersucht.

1. Nährlösung + reine Cellulose.

Vorversuche bewiesen, daß die bei den Pilzen beschriebene Lösung b auch für Bakterien brauchbar war, wenigstens zeigten diese darin ein sehr starkes Wachstum. In 100 cm^3-Erlenmeyer-Kölbchen mit 60 ml Lösung b gaben wir 4 Streifen reine Cellulose (je 1,7 × 6 cm). Nach der Sterilisation wurde jede Kultur mit einer Bakteriensorte beimpft und bei 30° C dem Wachstum überlassen.

Schon nach 3 Wochen waren die Bakterien sehr stark gewachsen, sie hatten sich vor allem auf beiden Seiten der Cellulosestreifen in dicker Schicht angesiedelt.

Danach konnte man fast annehmen, den Bakterien würde die Cellulose als Substrat besonders zusagen; andererseits war uns aber bekannt, daß sich Bakterien in einem flüssigen Milieu immer mit Vorliebe auf einem anwesenden festeren Körper festsetzen und diesen förmlich tapezieren würden (Winogradsky, 1949).

Nach etwa 7 Monaten Kulturdauer hatten die Mikroorganismen die Cellulose nicht im geringsten angegriffen. Die Streifen sahen noch vollkommen unverändert aus; auch mikroskopische Untersuchung und Chlorzinkjod-Färbung führten zu der Feststellung, daß bei allen Kulturen kein Celluloseabbau stattgefunden hatte.

2. Nährlösung + Filtrierpapier.

Bei einem weiteren Versuch verwendeten wir einmal die nährstoffarme Lösung a, in der bei den Pilzen eine starke Cellulosezersetzung stattgefunden hatte, und daneben nochmals Lösung b. Die Kulturen wurden wieder in der gleichen Art angesetzt, nur diente diesmal Filtrierpapier Nr. 597 von Schleicher und Schüll als Cellulosequelle. In beide Nährlösungen impften wir zunächst jedes Bakterium einzeln und daneben wieder alle 5 Arten zusammen in das gleiche Kölbchen, um auch ihre Gesamtwirkung zu untersuchen.

Nach etwa 6 Monaten waren die Bakterien bei einer konstanten Temperatur von 30° C nur in Lösung b sehr stark gewachsen und hatten sich wieder in dicker Schicht auf dem Filtrierpapier angesiedelt, während

sie sich in Lösung a überhaupt nicht entwickelt hatten. Die Filtrierpapierstreifen waren bei beiden Kulturen absolut unverändert.

3. Celluloseagar.

Die Anwendung eines Celluloseagars zur Prüfung von Bakterien auf cellulosezerstörende Eigenschaft ist in der Literatur immer wieder beschrieben worden (Kellermann u. Mc Beth, 1912; Löhnis, 1935; Winogradsky, 1949 u. a.). Nach Winogradsky soll überhaupt festes Substrat für aerobe Bakterienkulturen von großem Vorteil sein, da diesen Organismen auf einer Agaroberfläche reichlicher Sauerstoff zur Verfügung steht, als es innerhalb einer Lösung der Fall sein kann.

Zur Herstellung des Celluloseagars wählten wir mit geringer Abänderung die von Winogradsky (1949) angegebene Vorschrift:

Lösung I: KH_2PO_4 1,00 g; $MgSO_4$ 0,50 g; NaCl 0,50 g; $FeSO_4$ 0,01 g; $MnSO_4$ 0,01 g; dest. H_2O 200,00 g. — Lösung II: $NaNO_3$ 0,20 g; $CaCO_3$ 0,10 g; Lösung I 10,00 g; dest. H_2O 30,00 g. — Lösung III: $NaNO_3$ 0,10 g; $(NH_4)_2SO_4$ 0,10 g; $CaCO_3$ 0,10 g; Lösung I 10,00 g; dest. H_2O 30,00 g. — Lösung IV: 2%ige *Sphagnum*-Abkochung.

Mit Hilfe von K_2CO_3-Lösung wurden die Nährlösungen auf einen bestimmten p_H-Wert eingestellt: Lösung II: p_H 6,0 und p_H 7,2; Lösung III: p_H 6,0 und p_H 7,2; Lösung IV: p_H 5,0.

Obwohl wir es bei unseren Versuchen mit Bakterien zu tun hatten, die in der Natur in einem stark sauren Bereich leben, wählten wir diesmal zum Vergleich auch eine Nährlösung von p_H 7,2, weil die Bakterien im Boden nur im neutralen oder schwach alkalischen Milieu zur Cellulosezersetzung befähigt sind.

Zur Herstellung einer emulsionsartigen Celluloseaufschwemmung bereiteten wir uns zunächst eine Hydrocellulose nach Aimé Girard (Abderhalden, 1935), die nach Ansicht von Winogradsky der echten Cellulose näher kommt, als das Präzipitat von Kellermann (Kellermann u. McBeth, 1912). Die gewonnene Hydrocellulose war sehr brüchig und ließ sich leicht mit einem Mörser zusammen mit der jeweiligen Nährlösung zu einer milchigen Flüssigkeit zerreiben, die auf einen Cellulosegehalt von 1% gebracht, dann zusammen mit Agar (1%) sterilisiert und in Petri-Schalen ausgegossen wurde.

Diese Platten beimpften wir wieder mit allen Bakterien zusammen, die zuvor in der Lösung b, welche als Kohlenstoffquelle viele kleine Filtrierpapierstückchen enthielt, kultiviert worden waren. Diese mit Bakterien dicht bewachsenen Papierstückchen dienten als Impfmaterial und wurden fest auf die Oberfläche des Celluloseagars angedrückt. Die Schalen stellten wir bei 30° C auf.

Nach einigen Monaten zeigten die auf p_H 7,2 eingestellten Kulturen das stärkste, alle übrigen ein schwächeres, aber deutlich erkennbares Bakterienwachstum. Eine Cellulosezersetzung, welche eine Aufhellungszone rings um die Impfstücke zur Folge gehabt hätte, konnten wir auf keiner Celluloseagarplatte feststellen, folglich waren die Hochmoorbakterien selbst bei günstigsten Sauerstoffverhältnissen und höherem p_H-Wert nicht zum Celluloseabbau befähigt.

Die Prüfungen der aus einem Hochmoor isolierten Pilze und aeroben Bakterien auf cellulosezersetzende Fähigkeiten führten zu folgenden 2 wichtigen Ergebnissen:

a) Für den Celluloseabbau in den obersten, sauerstoffhaltigen Hochmoorschichten sind allem Anschein nach zum größten Teil die Pilze

verantwortlich zu machen. Diese Annahme findet man auch von anderen Autoren öfters bestätigt, die zum Teil von einem Fehlen cellulosezersetzender Bakterien im Hochmoor berichten (Christensen, 1913 und 1915; Daszewska, 1911/12; Niethammer, 1944/45). Das Überwiegen der Pilztätigkeit in diesen Schichten mag vielleicht auch mit durch den hohen Säuregrad, der für das Hochmoor charakteristisch ist, bedingt sein, während die aeroben Bakterien meist nur in einem annähernd neutralen Milieu wirksam sein können. Dagegen liegen unter anaeroben Bedingungen die Verhältnisse anders, hier weisen die Humusböden eine viel größere Pufferwirkung auf, als unter aeroben Bedingungen und ermöglichen dadurch eine optimale Bakterientätigkeit (Hwang u. Frank, 1938/39).

b) Als auffällige Erscheinung muß weiter erwähnt werden, daß unter sonst gleichen Bedingungen das Filtrierpapier von weitaus mehr Pilzen angegriffen und auch immer wesentlich stärker abgebaut wurde, als das bei reiner Cellulose der Fall war. Dies mag in der Tatsache begründet sein, daß nach verschiedensten Literaturangaben (Daszewska, 1911/12; Holländer, 1932; Winogradsky, 1949) Filtrierpapier stets noch einen Gehalt an Oxy- und Hemicellulose aufweist, die beide leichter hydrolysierbar sind, als reine Cellulose.

III. Sphagnum-Abbau.

Aus dem Schrifttum geht immer wieder hervor, daß in der Natur vor allem die *Sphagnum*-Stämmchen dem Abbau unterliegen, während die zarten Blättchen meist noch im Torf anzutreffen sind. Aus diesem Grunde interessiert uns im Zusammenhang mit dem *Sphagnum*-Abbau vor allem die Anatomie der *Sphagnum*-Stämmchen sowie die Beschaffenheit ihrer Zellmembranen:

Die *Sphagnum*-Stämmchen, deren Rinde aus einigen Schichten toter, leerer Zellen besteht, besitzen keinen Zentralstrang; seine Stelle nimmt ein dünnwandiges, farbloses Mark ein, dessen Zellen nach außen zu an Größe abnehmen, während sich die Zellwände in dieser Richtung beträchtlich verstärken. Ohne scharfe Grenze geht so das parenchymatische Mark in einen aus prosenchymatischen Zellen bestehenden Zentralzylinder über. Dieser wird gelegentlich auch als „Holzzylinder" bezeichnet, in Wirklichkeit kommen aber verholzte Zellwände bei Laubmoosen nicht vor (Engler, 1924).

Nach Bünning (1927) bestehen die Primärmembranen der *Sphagnen* aus Cellulose, in welche Pectinstoffe eingelagert sind. Im Zentralkörper der Stämmchen erfahren diese Membranen oft noch eine starke sekundäre Verdickung; sie sind durch einen besonders hohen Pectingehalt ausgezeichnet. Auf der Primärmembran liegt beiderseitig mindestens 1 Cellulosemembran.

In der Regel erhält man bei *Sphagnum*, wie überhaupt bei allen *Muscineen*, mit Chlorzinkjod keine direkte Cellulosereaktion der Zellwände; eine Violettfärbung ist erst nach vorhergehendem Kochen mit NaOH oder nach 24stündiger Behandlung mit Eau de Javelle usw. zu erreichen. Durch diese Vorbehandlung wird ein phenolartiger Körper, das „Sphagnol", herausgelöst. Nach Ansicht von Czapek (1899) scheint das Sphagnol chemisch an die Cellulose der Zellwände gebunden zu sein und als ein Sphagnolcelluloseäther vorzuliegen; ferner soll dieser Phenolkörper die Eigenschaft eines Schutzstoffes mit antiseptischer Wirkung be-

sitzen. Das Sphagnol befindet sich in den Primär- und in den Cellulosemembranen in gleicher Menge, außerdem ist eine reichliche Einlagerung an der Grenze zweier Lamellen zu beobachten (Bünning, 1927).

a) Sphagnum-Abbau in der Natur.

Um in Erfahrung zu bringen, in welcher Weise und bis zu welchem Grad die *Sphagnen* in den einzelnen Hochmoorschichten selbst einen Abbau erleiden, untersuchten wir die etwa 9—11 cm unter dem lebenden *Sphagnum* liegenden, noch sauerstoffhaltigen Schichten verschiedener Standorte (Sossauer Filz) und isolierten daraus Bruchstücke ehemaliger *Sphagnum*-Stämmchen. Diese ursprünglich etwas brüchigen Stämmchenteile wurden in eine Gelatinelösung eingebettet und lieferten dann unter Anwendung eines Gefriermikrotoms sehr dünne, unbeschädigte Längs- und Querschnitte, die im Mikroskop eine deutliche Zersetzung zeigten. Bei allen untersuchten Stämmchenteilen waren die Zellen innerhalb des Zentralzylinders zum größten Teil und meist sogar völlig herausgelöst, was wahrscheinlich auf eine vorausgegangene Zersetzung der Zellwände im parenchymatischen Mark zurückzuführen ist (siehe Abb. 3).

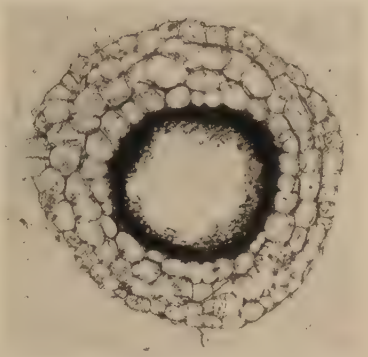


Abb. 3. Querschnitt durch *Sphagnum*-Stämmchen aus 9—11 cm Tiefe (unter natürlichen Verhältnissen angegriffen). Vergr. 90 mal.

Einen stärkeren Abbau konnten wir auch in etwa 1,25 m Tiefe kaum feststellen. Diese Schicht bestand allerdings nicht wie die obere aus mehr oder weniger zersetzten, aber noch erkennbaren Pflanzenteilen, sondern aus einer feinkörnigen Torfmasse, so daß zur Erkennung der *Sphagnum*-Reste direkte Schnitte durch die gesamte Torffläche notwendig waren.

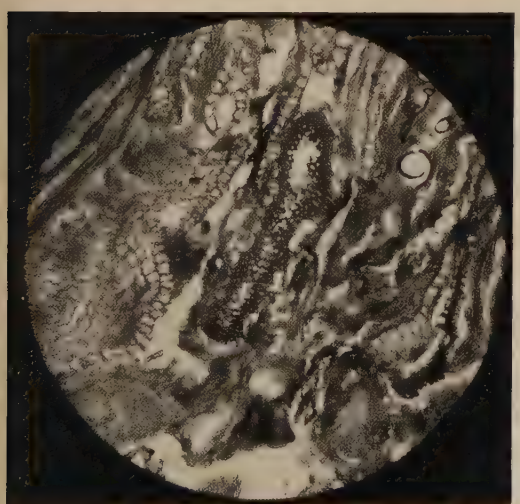


Abb. 4. Schnitt durch *Sphagnum* aus 1,25 m Tiefe. Vergr. 90 mal.

Die zu untersuchende Torfmasse wurde vorsichtig ohne Druck in kleine Würfel von etwa 1 cm Kantenlänge zerteilt und diese, um den Zerfall innerhalb einer Flüssigkeit zu verhindern, in Verbandmull eingenäht. Nach Heraussaugen der Luft ließen wir auf die Torfstückchen bei 30—35° C eine 5%ige und danach noch 4 Tage lang eine 10%ige Gelatinelösung einwirken und gossen dann die Würfelchen zusammen mit der letzten Lösung in eine Schale aus. Nach dem Erstarren (am besten im Eisschrank) ließen sich die mit Gelatine

zusammengehaltenen Torfstückchen nach dem Ablösen der Mullhülle mit Hilfe eines Gefriermikrotoms gut quer und längs zu 20 μ dicken, quadratischen Schnitten schneiden, die im Mikroskop neben einigen anderen Pflanzenresten vor allem Quer- und Längsschnitte von *Sphagnum*-Teilen zeigten; die Blättchen machten noch einen völlig unzerstörten Eindruck, während bei den Stämmchen die Zellen innerhalb des Zentralzylinders herausgelöst waren (siehe Abb. 4). Auch alle beliebigen Farbreaktionen lassen sich mit diesen Torfschnitten durchführen, wenn man sie zuvor auf Objektträger aufklebt und die Gelatine vollkommen herauslöst.

Nachdem uns nun Schnitte von im Hochmoor zerstörtem *Sphagnum* als Vergleichsmaterial zur Verfügung standen, konnten wir uns der eigentlichen Untersuchung unserer isolierten Pilze und aeroben Bakterien zuwenden.

b) Sphagnum-Abbau durch Pilze.

Schon die 2 vorangegangenen Kapitel haben gezeigt, daß die verwendeten Mikroorganismen zum größten Teil die Fähigkeit besitzen, Pectin und Cellulose mehr oder weniger stark abzubauen; dies ließ vermuten, daß sie auch die in der Hauptsache aus Pectin und Cellulose bestehenden Zellmembranen der *Sphagnen* mittels ihrer Fermente weitgehendst zerstören würden. Da in der Natur fast ausschließlich die *Sphagnum*-Stämmchen eine Zersetzung erleiden, ließen wir unsere in vitro zu untersuchenden Mikroorganismen direkt auf sehr dünne (40 μ) Stämmchen-Querschnitte von *Sphagnum palustre* einwirken, und zwar in 100 cm^3-Erlenmeyer-Kölbchen, die knapp bis zur Hälfte mit grünem *Sphagnum* gefüllt wurden. Nachdem die zu untersuchenden Schnitte vorsichtig auf ein kleines Filtrierpapierstreifchen gebracht worden waren, legten wir dieses auf die geglättete *Sphagnum*-Oberfläche und durchfeuchteten das Moos so stark, daß das Wasser im Kölbchen bis fast zum Filtrierpapier reichte. Die mit Flüssigkeit reichlich gesättigte Grundlage sollte ein Austrocknen des Filtrierpapiers und damit vor allem der Schnitte verhindern. Nach der Sterilisation wurden 2 Ränder des Papierstreifens mit dem jeweiligen Pilz beimpft, der in den meisten Fällen alsbald das ganze Filtrierpapier mit einer dicken Myceldecke überzog und damit noch weiter dazu beitrug, die Schnitte vor dem Austrocknen zu bewahren. Als einzige Nahrung stand den Mikroorganismen nur die *Sphagnum*-Grundlage, sowie das mit *Sphagnum*-Extrakt getränkte Filtrierpapier zur Verfügung. Trotzdem entwickelten die Pilze ein außerordentlich gutes Wachstum, vor allem auf dem Filtrierpapier, so daß die zu untersuchenden Schnitte direkt ihrem eventuellen Angriff ausgesetzt waren.

Nachdem die *Sphagnum*-Schnitte etwa 1 Jahr bei Zimmertemperatur der Pilzeinwirkung überlassen worden waren, lösten wir sie unter dem Binokular vorsichtig von der Unterlage, mit der sie meist fest verbunden waren, ab, befreiten sie vom anhaftenden Pilzmycel und mikroskopierten sie.

Da das Pectin mit Rutheniumrot eine intensive Rotfärbung ergibt, wählten wir diesen Farbstoff zum Nachweis für noch vorhandenes Pectin in den *Sphagnum*-Membranen; Chlorzinkjod zeigte uns nach 24stündiger Vorbehandlung mit Eau de Javelle die Cellulose an.

Überraschenderweise hatten die Mikroorganismen trotz ihrem starken Wachstum in den meisten Fällen das *Sphagnum* nur unbedeutend oder oft überhaupt nicht angegriffen.

Als einziger von den 20 untersuchten Pilzen vermochte nur *5010* (*Sym*) das *Sphagnum* derart intensiv abzubauen, daß der erreichte Zersetzungsgrad annähernd dem in der Natur beobachteten gleichkam. Der Pilz hatte den gesamten Papierstreifen mit seinem braunen Mycel dick

überwachsen, das Filtrierpapier weitgehendst zerstört, aber auch die *Sphagnum*-Schnitte stark angegriffen. Bei einigen Schnitten war der Abbau so weit fortgeschritten, daß sie nur noch aus dem Zentralzylinder bestanden, während alle innerhalb von diesem liegenden Zellen (= Mark) fast vollkommen herausgelöst waren (Abb. 5). Aber auch die übrigen Schnitte zeigten im Mark nur noch letzte Reste ehemaliger Zellwände. Diese waren hauchdünn geworden und soweit abgebaut, daß an vielen Stellen schon ein Auseinanderweichen der deformierten Zellen zu beobachten war. Mit Rutheniumrot erfolgte oft gar keine oder nur noch eine

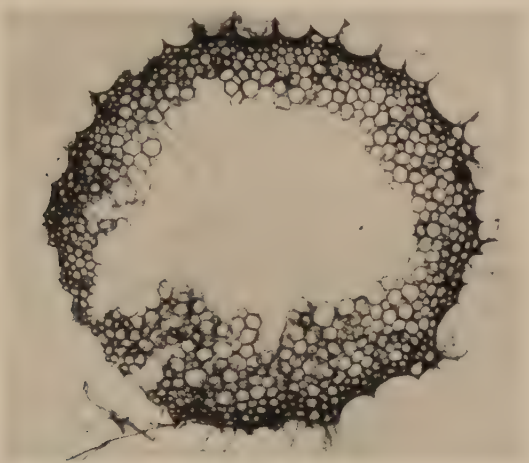


Abb. 5. Abbau im *Sphagnum*-Stämmchen durch den Pilz *5010* (*Sym*). Vergr. 90 mal.

sehr schwache Färbung. Auch mit Chlorzinkjod zeigten die übriggebliebenen Membranen nach der üblichen Eau de Javelle-Behandlung bei einigen Schnitten überhaupt keine Cellulosefärbung mehr, bei anderen wurde diese nur noch durch einen schwach violetten Schimmer angedeutet.

Einige andere Kulturen wiesen einen wesentlich schwächeren, aber doch noch deutlich erkennbaren *Sphagnum*-Abbau auf; sie seien zunächst einmal nach abnehmendem Zersetzungsgrad geordnet aufgeführt: *4318c* (*Sym*) → *478* (*Sym*) → *4719* (*Sym*) → *Rh 53* (*Sym*) → *5021* (*Sym*).

Der Pilz *4318c* (*Sym*) hatte nur das Filtrierpapier mit einer dicken grauen Mycelschicht überzogen und dieses stark zersetzt. Auch die *Sphagnum*-Schnitte ließen eine beginnende Zerstörung deutlich erkennen. Vor allem hatte das Pectin eine Veränderung erfahren, denn bei der Behandlung mit Rutheniumrot zeigten die Membranen nicht die charakteristische Rotfärbung, sondern waren schwach lachsfarbig getönt. Auch die Zellwände im Mark erschienen stark angegriffen; sie waren sehr dünn geworden und wichen an einigen Stellen auseinander. Da nach einer Eau

de Javelle-Behandlung mit Chlorzinkjod nur noch eine ganz schwache Violettfärbung der Membranen erfolgte, hatte also auch die Cellulose in den Schnitten eine Zersetzung erlitten.

Obwohl sich bei diesem Pilz mit Hilfe unserer angewandten GÄUMANN-Methode keine exocellulare Pectinase nachweisen ließ, scheint also *4318c* (*Sym*) — wie auch *4719* (*Sym*) — in der Natur doch zum Pectinabbau befähigt zu sein. Wir hatten nämlich zum Nachweis von Pectinzersetzung zusammen mit *Sphagnum*-Schnitten auch Schnitte einer *Molinia*-Pfeife dem Pilzangriff ausgesetzt; diese besitzt nur vereinzelte pectinhaltige Zellwände im Siebteil. Wie wir mit Enzympräparaten feststellen konnten, läßt sich diese geringe Pectinmenge sehr leicht herauslösen; es bleibt dann die Färbung mit Rutheniumrot aus. Auch nach Einwirkung der beiden Pilze *4318c* und *4719* war das Pectin aus den *Molinia*-Schnitten herausgelöst, so daß diese mit Rutheniumrot keine Färbung mehr zeigten. Unter den gegebenen Bedingungen waren auch diese 2 Mikroorganismen in der Lage, Pectin in pflanzlichen Membranen zu zersetzen, wie sie es auch in geringem Maße bei den pectinreichen *Sphagnum*-Schnitten bewiesen hatten.

Auch der Pilz *478* (*Sym*) hatte sich nur auf dem Papierstreifen ausgebreitet und diesen mit einer dicken grauen Mycelschicht überzogen. Während das Filtrierpapier durch die Pilzeinwirkung total zersetzt war, ließ sich bei den *Sphagnum*-Schnitten nur der Beginn einer Zerstörung feststellen. Die innerhalb des Zentralzylinders gelegenen Zellmembranen waren deutlich dünner geworden und mit Rutheniumrot zeigte sich nur noch eine schwache Rosa-Färbung, so daß wohl beide Erscheinungen auf einen stattgefundenen Pectinabbau zurückzuführen sind. — Auch die Cellulosereaktion war nach üblicher Vorbehandlung etwas schwächer als gewöhnlich, jedoch trat noch eine deutliche Violettfärbung der Membranen ein.

Auch bei der Kultur *4719* (*Sym*) hatte wieder das schwache Pilzwachstum ausschließlich auf dem Filtrierpapier stattgefunden, dieses zeigte graue und braune fleckige Verfärbungen und im Mikroskop eine starke Zersetzung der Cellulosefasern. Aber auch die der Pilzeinwirkung ausgesetzten *Sphagnum*-Schnitte ließen eine schwache Zerstörung erkennen. Ihre Membranen im Mark, welche mit Rutheniumrot nur noch schwache Rotfärbung ergaben, hatten an Stärke wesentlich verloren und verursachten dadurch eine leichte Deformierung mancher Zellen. Es war anscheinend — wie bereits oben ausgeführt — ein schwacher Pectinabbau erfolgt. Nach Vorbehandlung mit Eau de Javelle wurden die Zellwände durch Chlorzinkjod noch deutlich violett gefärbt.

Die Kultur *Rh 53* (*Sym*) zeigte sowohl auf der *Sphagnum*-Oberfläche als auch auf dem Filtrierpapier Pilzwachstum. Das Filtrierpapier hatte stellenweise eine hellbraune Verfärbung und eine teilweise Zersetzung

seiner Cellulosefasern erlitten. Die *Sphagnum*-Schnitte zeigten den Beginn von Zersetzung; die Zellmembranen im Mark waren allgemein etwas dünner geworden und wichen an einigen Stellen ein wenig auseinander, färbten sich aber mit Rutheniumrot noch unverändert. Auch Chlorzinkjod verursachte nach der üblichen Vorbehandlung noch deutliche Violettfärbung.

Die Kultur *5021* (*Sym*) hatte sehr schwaches Pilzwachstum an den Impfstellen aufzuweisen, das Filtrierpapier zeigte einige hellbraune Flecken, seine Cellulosefasern waren aber völlig unzerstört. Auch die *Sphagnum*-Schnitte konnte man kaum als angegriffen bezeichnen, nur die Zellmembranen erschienen etwas dünner. Doch trat mit Rutheniumrot und Chlorzinkjod die unveränderte Pectin- bzw. Cellulosefärbung ein.

Alle übrigen Pilze waren unter den gegebenen Verhältnissen nicht in der Lage, die *Sphagnum*-Schnitte irgendwie zu verändern, obwohl sie in den meisten Fällen ein dickes Hyphengeflecht über diese ausgebreitet hatten.

Da es uns fast unglaublich erschien, daß selbst die *Penicillien* als stärkste Pectin- und Cellulosezerstörer keinen zersetzenden Einfluß auf *Sphagnum* ausübten, ließen wir einen Vertreter von ihnen — *501* (*P*) — nochmals in einer nährstoffhaltigen Kulturlösung auf *Sphagnum*-Schnitte einwirken. Doch das neue Ergebnis fiel gleich allen vorhergehenden wieder völlig negativ aus. *So vertiefte sich der vorher gewonnene Eindruck noch mehr, daß hauptsächlich den Symbionten die Aufgabe des Sphagnum-Abbaus zukommt, während sich die Penicillien und Verticillien wahrscheinlich vollkommen passiv dabei verhalten.*

Nach Untersuchung der einzelnen Pilze auf ihre sphagnumzersetzende Fähigkeit, sollte nun noch das Zusammenwirken aller Pilze überprüft werden.

Diese Versuche ließen sich natürlich nicht auf Filtrierpapier ausführen, da nicht jede Stelle und damit jeder Schnitt gleich stark von allen Organismen beeinflußt worden wäre; hierfür waren Nährlösungskulturen vorteilhafter. Wir verwendeten wieder die nährstoffarme Omelianski-Lösung (a), sowie die peptonhaltige Lösung b und ließen in beiden alle Pilze zusammen — außer *5010* (*Sym*), der uns schon als starker *Sphagnum*-Zerstörer bekannt war — auf dünne Querschnitte von *Sphagnum*-Stämmchen bei Zimmertemperatur einwirken.

Neben den Schnitten setzten wir den Kulturen noch zahlreiche, in kleine Stückchen zerteilte *Sphagnum*-Stämmchen zu; die Anwesenheit von Pectin und Cellulose natürlicher Herkunft sollte die Pilze zu einer stärkeren Enzymproduktion anregen.

Nach einigen Monaten zeigte die gehaltreiche Lösung b sehr starkes Pilzwachstum, und zwar hauptsächlich auf der Flüssigkeitsoberfläche, während sich die Pilze bei den nährstoffarmen Kulturen nur sehr schwach im Innern der Lösung entwickelt und vor allem um die *Sphagnum*-Anteile herum angesiedelt hatten. Die Schnitte waren meist von Hyphengeflecht umschlossen.

Wie wir es fast voraussehen konnten, hatten die *Sphagnum*-Schnitte nur in der schwachen Nährlösung a eine leichte, aber deutlich wahrnehmbare Zersetzung erfahren. Hier waren die Zellmembranen im Mark auffallend dünner geworden, sie wichen an vielen Stellen auseinander und zeigten mit Rutheniumrot nur noch eine schwache Rotfärbung. Allerdings war der Abbau noch nicht bis zu einer Deformierung der Zellen fortgeschritten. Mit Chlorzinkjod erfolgte bei den dünnen Membranen nach der üblichen Vorbehandlung eine violette, jedoch wesentlich abgeschwächte Cellulosefärbung.

Es hatte also unter den gegebenen Bedingungen zwar ein deutlich erkennbarer *Sphagnum*-Abbau stattgefunden, doch führte auch das Zusammenwirken der gewählten 19 Pilze noch nicht zu einem naturähnlichen Zersetzungsgrad.

c) Sphagnum-Abbau durch aerobe Bakterien.

Die Bakterien ließen wir in flüssigen Kulturen auf dünne *Sphagnum*-Schnitte einwirken, und zwar verwendeten wir zunächst eine peptonhaltige *Sphagnum*-Abkochung, die den Organismen ein der Natur angepaßtes Milieu bieten sollte. Zuerst wurde jedes Bakterium einzeln auf seine sphagnumzersetzende Wirkung untersucht. Das Bakterienwachstum erfolgte bei 30° C; es war nicht sehr stark, hatte aber doch eine deutliche Trübung der Lösung zur Folge.

Nach etwa 1 Jahr machten wir bei allen Bakterienkulturen nach Färbungen mit Rutheniumrot und Chlorzinkjod die eindeutige Feststellung, daß die *Sphagnum*-Schnitte nicht die geringste Veränderung aufwiesen.

Darauf prüften wir noch die Einwirkung der Bakterien im einzelnen und in ihrer Gesamtheit auf *Sphagnum*-Schnitte in einer völlig anderen Nährlösung (peptonhaltige Czapek-Dox-Lösung, siehe Lösung b). In dem neugewählten Milieu entwickelten zwar die Organismen bei 30° C ein wesentlich kräftigeres Wachstum, doch hatten trotzdem die Schnitte nach 1 jähriger Kulturdauer ihr unverändertes Aussehen beibehalten.

d) Künstlicher Sphagnum-Abbau durch reine Enzymlösungen.

Neben der Einwirkung der gesamten, von Mikroorganismen frisch produzierten Enzyme auf *Sphagnum* untersuchten wir auch das Aussehen der Schnitte nach Behandlung mit einer im Handel erhältlichen Pectinase und Cellulase, um festzustellen, ob die Wirkung dieser 2 reinen Fermente allein eine Auflösung der *Sphagnum*-Membranen herbeiführen kann.

1. Pectinase-Lösung.

Zunächst behandelten wir dünne Querschnitte von *Sphagnum*-Stämmchen nur mit reiner Pectinase, und zwar mit „Filtragol" von Bayer.

Die wirksamste Konzentration stellten wir in einem Vorversuch unter Anwendung eines Viscosimeters fest. Eine 1%ige Filtragol-Lösung vermochte das Pectin

am intensivsten zu spalten; deshalb führten wir alle folgenden Versuche mit dieser Konzentration durch. Die Pectinase-Lösung wurde mit Hilfe eines Bakterienfilters keimfrei gemacht, und dann ließen wir sie bei 30° C auf die in ein wenig Wasser sterilisierten Schnitte einwirken. Nach einigen Tagen verliert bekanntlich die Enzymlösung ihre Wirksamkeit, wir dekantierten diese infolgedessen vorsichtig von den Schnitten und ersetzten sie durch frisch bereitete Filtragol-Lösung.

Dieses Verfahren wiederholten wir 18mal, färbten die Schnitte dann zusammen mit unbehandelten Vergleichsschnitten mit Rutheniumrot und fanden, daß eine Pectinauflösung kaum oder gar nicht stattgefunden hatte; die Zellwände erschienen noch ziemlich dick und zeigten mit Rutheniumrot eine deutliche Färbung, ein Beweis dafür, daß noch reichlich Pectin in den Membranen vorhanden war. Dieses Ergebnis war insofern nicht sehr überraschend, als bekannt ist, daß in den Membranen das Pectin in der Cellulose eingebettet liegt (Bünning, 1927) und wahrscheinlich von letzterer so fest umschlossen wird, daß es einem Angriff nur schwer zugänglich ist.

2. Cellulase-Lösung.

In einem Parallelversuch behandelten wir die sterilen *Sphagnum*-Schnitte bei 30° C abwechselnd mit einer Pectinase- und Cellulase-Lösung.

Die Cellulaselösung stellte eine 5%ige Luizym-Lösung dar. Nachdem die beiden Fermente getrennt auf die Schnitte eingewirkt hatten, prüften wir diese wieder zusammen mit dem Vergleichsmaterial.

Die Ergebnisse bestätigten in geringem Maße unsere Erwartungen, denn die mit beiden Enzymen behandelten Schnitte ließen nun doch einige Veränderungen erkennen. Die Zellmembranen hatten wesentlich an Stärke eingebüßt, was größtenteils eine Deformierung der Zellen mit sich brachte; an manchen Stellen wichen sogar die Zellwände etwas auseinander. Mit Rutheniumrot erfolgte zwar eine wesentlich schwächere, aber dennoch deutlich erkennbare Färbung, die auf einen noch vorhandenen Pectingehalt hinwies.

Alle in diesem Kapitel beschriebenen Versuche führten also zu dem Ergebnis, daß

a) unter den gewählten Bedingungen allein die Pilze — und zwar nur einige Symbionten — dazu befähigt sind, sichtbare Zerstörungen in den *Sphagnum*-Membranen hervorzurufen,

b) Pectinase allein nicht in der Lage ist, das Pectin aus den Membranen herauszulösen; dieses muß zuvor von der mit ihm verbundenen Cellulose abgetrennt und freigelegt werden.

Schlußbetrachtung.

Das Ergebnis, daß die *Sphagnum*-Membranen, die doch zum größten Teil aus Pectin und Cellulose zusammengesetzt sind, sich nicht durch die enzymatische Wirkung von reiner Pectinase und Cellulase zer-

setzen lassen, mag im ersten Moment fast unglaublich erscheinen. Selbst viele Pilze, die nachgewiesenermaßen sowohl die Cellulose des Filtrierpapiers, als auch das gebotene Pectin vollständig abzubauen vermochten, übten meist keinen oder nur einen ganz minimal zerstörenden Einfluß auf *Sphagnum* aus. Beschäftigt man sich jedoch einmal mit dieser Frage eingehender, so kann man in der Literatur viele Aufzeichnungen finden, die einen Weg weisen, dieses rätselhafte Verhalten der Mikroorganismen zu erklären.

Einen wesentlichen Beitrag leistet hierzu die interessante Tatsache, daß die Erreger der Cellulosegärung aeroben und anaeroben Charakters die Cellulose viel energischer abbauen, oder überhaupt erst dazu befähigt werden, wenn sie nicht in Reinkultur, sondern in Gruppen mit „Begleitmikroben" auftreten, die meist selbst keine cellulosezersetzende Wirkung besitzen (Rokitzka, 1949). Gutgisser (1939) glaubt dieses Zusammenwirken mit der Annahme begründen zu können, daß die von dem cellulosezerstörenden Bakterium gebildeten Stoffwechselprodukte, welche wahrscheinlich auf dieses eine hemmende Wirkung ausüben, von den Begleitbakterien weiterverarbeitet und damit unschädlich gemacht werden.

Es können aber auch Bakterien auf Pilze oder verschiedene Pilze gegenseitig einen begünstigenden Einfluß ausüben.

Hierzu berichtet z. B. Waksman (Waksman u. Hutchings, 1937/38), daß Pilze, die als gute Cellulosezersetzer bekannt waren (z. B. *Trichoderma*) in Reinkultur die Cellulose in den Luzernerückständen nicht abbauten. Sobald jedoch ein nicht cellulosezerstörender, aber zum Eiweißabbau befähigter Organismus gleichzeitig zugegen war (z. B. *Rhizopus*), wurde *Trichoderma* zur Cellulosezersetzung gezwungen. Als allgemeine Regel stellte Waksman fest, daß eine einzelne Art niemals organische Substanzen in dem Maß abzubauen vermochte, als es bei einem Bodeninfus der Fall war.

Das Zusammenwirken verschiedener Mikroorganismen begründet Rippel-Baldes (1952) damit, daß wahrscheinlich in diesen Fällen eine wechselseitige Belieferung erfolgt. Die unterstützende Wirkung der Bakterien bei der Pilztätigkeit kann einmal darauf beruhen, daß die Bakterien den Pilzen einen organischen Wirkstoff liefern, ohne den letztere sich nicht entfalten können. Oder die Bakterien üben in der Art einen begünstigenden Einfluß aus, daß sie die der Keimung schädlichen Stoffe unwirksam machen. In anderen Fällen zeigen verschiedene Pilze eine wechselseitige Wirkung, in dem jeder von ihnen eine Komponente für einen bestimmten Wirkstoff (Ferment, Vitamin usw.) zur Verfügung stellt.

Nach diesem Blick in die wahren, der Natur eigenen Verhältnisse, erscheint es fast selbstverständlich, daß es uns in vitro nicht gelingen

wollte, mit einem einzelnen Mikroorganismus oder auch mit allen Pilzen und ein andermal mit allen Bakterien zusammen einen *Sphagnum*-Abbau genau so zu rekonstruieren, wie er sonst in der Natur unter Mitwirkung verschiedenster und bestimmter Organismen stattfindet.

Wir dürfen aber den minimalen *Sphagnum*-Abbau nicht allein mit dem geschilderten Verhalten der Mikroorganismen begründen, denn viele Angaben im Schrifttum belehren uns immer wieder darüber, daß gerade die Polysaccharide des *Sphagnums* der Zersetzung einen größeren Widerstand bieten, als die der höheren Pflanzen.

Waksman (1932) machte z. B. bei seinen vergleichenden Untersuchungen verschiedener Torfarten stets die Beobachtung, daß die Cellulose sowie die Hemicellulosen der *Sphagnen* — zu letzteren zählte er auch Pectin — auffallend langsam zersetzt wurden. Diese allgemein anerkannte Tatsache findet aber in der Literatur die verschiedensten Begründungen:

Waksman (1932) nimmt an, daß sich die Widerstandsfähigkeit der *Sphagnum*-Inhaltstoffe entweder auf die physikalischen Bedingungen, unter denen sie in der Pflanze vorkommen, oder aber auch auf ihre spezifische chemische Natur zurückführen läßt. Letzteres wird auch noch von vielen anderen Autoren als Ursache angesehen, allerdings gehen dabei die Ansichten darüber, in welcher schwerangreifbaren chemischen Verbindung die einzelnen Substanzen in den Membranen vorliegen, weit auseinander.

Rumjantzewa (1939) versuchte ihr Ergebnis, daß *Sphagnum*-Cellulose dem mikrobiellen Abbau einen größeren Widerstand entgegensetzte als *Eriophorum*-Cellulose, nicht wie Waksman durch die Anwesenheit der im *Sphagnum* in großer Menge vorhandenen Polyuronide und ihrer Schutzwirkung zu erklären, sondern schrieb dies einem hohen Lignin-Gehalt im *Sphagnum* zu, während *Eriophorum* nur geringe Mengen von diesem Stoff enthalten sollte. Diese Behauptung konnte sie allerdings nicht mit einem einwandfreien Ligninnachweis belegen, sondern mußte selber zugeben, daß bei Anwendung der von ihr gewählten Methode von Soen-Óden die Schwefelsäure auch den Uronsäurekomplex und manchmal sogar die Cellulose selbst angreifen konnte; diese Nebenwirkungen täuschen gerne einen erhöhten Ligningehalt vor.

Man kann zwar manchmal auch in anderen Arbeiten Angaben über einen Ligningehalt von *Sphagnum* finden (Waksman, 1936; Plank, 1946), doch meist nur im Zusammenhang mit anderen Stoffen, die sich in dem Extraktionsanteil mit einem für Lignin geeigneten Lösungsmittel vorfinden. Waksman gibt z. B. in einer Tabelle an, daß Lignine und ligninähnliche Komplexe zusammen 7,18% der lufttrockenen *Sphagnum*-Masse ausmachen.

An anderer Stelle teilt Waksman (1932) mit, daß nach Behandlung von *Sphagnum* mit Alkali die Cellulose leicht einem Angriff durch Mikroorganismen unterliegt. Er begründet diese Erscheinung damit, daß durch die Vorbehandlung das Lignin und ein Teil der Hemicellulose entfernt wurde, allerdings könnte möglicherweise auch der physikalische Zustand des Materials dabei geringfügige Veränderungen erfahren haben. Wir dürfen aber bei diesen Mitteilungen mit einiger Berechtigung annehmen, daß neben Lignin und Hemicellulose noch andere abbau-

hemmende Stoffe durch Alkali extrahierbar sind, auf die wir noch später näher eingehen werden.

Marcusson (1925) beschränkt sich hingegen darauf, die *Sphagnen* als „fast ligninfrei" anzusehen, während andere Autoren sogar Beweise dafür erbringen konnten — teils in Übereinstimmung mit unseren Untersuchungen durch Mikroreaktionen auf Lignin in den Torfmoosen (Czapek, 1899; Engler, 1924; Bünning, 1927 u. a.), teils auf Grund chemischer Analysen (Kondratjew, 1949) —, daß *Sphagnum* keinen Gehalt an natürlichem Lignin aufweist.

Nach diesen unterschiedlichen Angaben erscheint es sehr gewagt, die Widerstandsfähigkeit der Sphagnummembranen allein ihrem Gehalt an Lignin zuzuschreiben, zumal dessen Anwesenheit noch sehr in Frage gestellt ist. Wir wollen daher versuchen, auch noch andere Möglichkeiten aufzuzeichnen, die zur Erklärung des resistenten Charakters der Sphagnen beitragen können:

Es ist z. B. eine bekannte Erscheinung, daß selbst mit chemischen Reagenzien wie Kupferoxydammoniak ohne Vorbehandlung bei *Sphagnum* nur eine Quellung der Zellmembranen erfolgt und keine Lösung, wie sie bei reiner Cellulose unter diesen Bedingungen eintritt. Erst nach Entfernung des an die Cellulose gebundenen Sphagnols durch Kochen mit Lauge ist eine teilweise Lösung erreichbar (Engler 1924, Bünning 1927). Alkali vermag also nicht nur — wie wir vorhin andeuteten — Lignin und Hemicellulose zu extrahieren, sondern auch das Sphagnol aus dem Sphagnolcelluloseäther abzuspalten und als Phenolat herauszulösen. Es erscheint daher nicht unmöglich, daß auch bei dem von Waksman beschriebenen Versuch die vom Sphagnol befreite Cellulose — ähnlich dem Verhalten gegenüber Kupferoxydammoniak — auch dem Angriff der Mikroorganismen einen geringeren Widerstand entgegensetzte. Die Vermutung, daß dem Sphagnol eine abbauhemmende Wirkung zukomme, findet noch eine Unterstützung in der Tatsache, daß dieser phenolartige Körper auch antiseptische Eigenschaften besitzt und ihm nach Aussage von Czapek (1899) der Charakter eines Schutzstoffes zukommt. Bei unseren Untersuchungen gelangten wir zu dem Ergebnis, daß in den Schnitten die Sphagnolverbindung durch die Einwirkung der Mikroorganismen keine Veränderung erfahren hatte; wir erhielten mit Chlorzinkjod erst nach der Eau de Javelle-Behandlung eine deutliche Cellulosereaktion.

Wie wir zu Beginn des Cellulose-Kapitels schon ausführlich dargelegt haben, weist auch die Struktur der *Sphagnum*cellulose einige Abweichungen gegenüber der gewöhnlichen Cellulose auf. Während in letzterer nur Glucosemoleküle in 1,4-β-glucosidischer Bindung aneinandergereiht sind, besitzt die *Sphagnum*-Cellulose zum großen Teil noch andere Zuckerpolymere, z. B. Xylane, sowie Oxycellulose usw. und besteht nur zu 3,8% aus Glucosanen mit 1,4-β-glucosidischer Verknüpfung. Es ist daher nicht verwunderlich, daß die celluloseauflösenden Fermente Cellulase und Cellobiase, welche eine hydrolytische Spaltung

der β-glucosidischen Bindungen herbeiführen, allein nicht zum Abbau der *Sphagnum*-Cellulose befähigt sind; ihre inhomogene, andersartige Zusammensetzung erfordert sicher noch zusätzlich einige andere Enzyme. Damit finden wir noch eine weitere Erklärung für das zuerst kaum glaubhafte Ergebnis, daß Mikroorganismen, die auf die Cellulose des Filtrierpapiers einen stark zerstörenden Einfluß ausübten, zum Abbau der *Sphagnum*-Cellulose absolut keine Fähigkeit zeigten. Es fehlten ihnen nicht nur, wie bereits erwähnt, die dazu notwendigen Begleitorganismen, sondern vor allem auch die hierzu geeigneten Fermente.

Es darf uns aus diesem Grunde auch nicht verwundern, daß selbst das Pectin der *Sphagnum*-Schnitte unter den gegebenen Kulturbedingungen nur ganz selten eine Veränderung aufzuweisen hatte, liegt dieses doch meist in der Mittellamelle als eine Pectin-Cellulose-Verbindung vor und muß vor einer direkten Zerstörung von der *Sphagnum*-Cellulose befreit werden.

Zusammenfassung der hauptsächlichsten Ergebnisse.

Es wurde eine Anzahl aus Hochmoor isolierter Pilze und aerober Bakterien untersucht.

1. Von den Pilzen besaßen alle *Penicillium*- und *Verticillium*-Arten sowie einige *Ericaceen*-Symbionten die Fähigkeit, das gebotene Pectin vollkommen oder zum mindesten sehr stark abzubauen, während von den aeroben Bakterien nur ein Vertreter pectolytische Wirkung zeigte. Die Pectinase, welche von den geprüften Mikroorganismen in die Nährlösung ausgeschieden wurde, stellte in allen Fällen ein konstitutives Enzym dar.

2. Unter den gegebenen Kulturbedingungen konnten die Bakterien weder reine Cellulose noch Filtrierpapier abbauen, während die Mehrzahl der untersuchten Pilze — und zwar alle *Penicillien* und *Verticillien* sowie die meisten Symbionten — hierzu die Fähigkeit besaß. Allerdings erfolgte je nach der Art und Zusammensetzung des Substrats ein verschieden starker Abbau. Grundsätzlich kann gesagt werden, daß ein nährstoffarmes Kulturmilieu — ganz gleich, ob Lösung oder *Sphagnum*-Grundlage — auf den Celluloseabbau einen außerordentlich begünstigenden Einfluß ausübte; ferner erlitt in allen Fällen das gebotene Filtrierpapier eine ungleich stärkere Zersetzung als reine Cellulose unter sonst gleichen Bedingungen.

3. Mit Hilfe einer neuen Methode war es uns möglich, Moorschichten aus verschiedener Tiefe auf den Zersetzungsgrad ihrer *Sphagnum*-Reste mikroskopisch zu untersuchen. Dies führte zu dem Ergebnis, daß in der Natur nur die *Sphagnum*-Stämmchen eine Zersetzung erleiden, und zwar werden zuerst die Zellwände innerhalb des Zentralzylinders herausgelöst, die neben Cellulose einen besonders hohen Pectingehalt besitzen. Von den untersuchten Pilzen zeigte nur ein Symbiont die Fähigkeit, *Sphagnum*

in ähnlicher Weise abzubauen, einige wenige, und zwar nur Symbionten, verursachten im Mark geringe Veränderungen der Zellmembranen, während alle *Penicillien* und *Verticillien*, die sich in den vorhergegangenen Versuchen als die stärksten Pectin- und Cellulosezerstörer erwiesen hatten, erstaunlicherweise das *Sphagnum* überhaupt nicht angriffen. Das gleiche negative Verhalten zeigten auch die *Mortierellen* und einige Symbionten sowie sämtliche aeroben Bakterien.

Auch reine Pectinaselösung war selbst in ihrer optimal wirksamsten Konzentration nicht in der Lage, das Pectin aus den *Sphagnum*-Membranen herauszulösen; vielmehr mußte zuerst einmal dieser Inhaltsstoff von der mit ihm vergesellschafteten Cellulose befreit werden, um einem Angriff zugänglich zu sein.

An dieser Stelle möchte ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. Burgeff, ganz besonders herzlich danken für die Überlassung der von ihm isolierten Pilze und aeroben Bakterien, sowie für seine großzügige Unterstützung und das ständige Interesse am Fortgang der Arbeit. Ferner danke ich auch Herrn Dr. Reinhard für die Mithilfe bei den photographischen Aufnahmen.

Literatur.

Abderhalden, E.: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. XII, Teil 2, S. 771—887 (1935): K. Demeter, Methoden zur mikrobiologischen Untersuchung von Boden.

Bavendamm, W.: Neue Untersuchungen über die Lebensbedingungen holzzerstörender Pilze. Zbl. Bakter. II **76** (1928). — Beaven, G. H., and F. Brown: The Pectic Enzymes of the Mould Byssochlamys fulva. Biochemic. J. **145**, 221 (1949). — Belikowa, N. M.: Einige Ergebnisse des mikrobiologischen Studiums des Torfes. Die Zersetzung der Cellulose im Torf. Torfjanoje djelv. **6**, 427 (1929) [Russisch], ref. Zbl. Bakter. II **84**, 146 (1931). — Blanck, E.: Aklimatische Bodenbildung und fossile Verwitterungsdecken. Berlin: Springer 1930. — Bock, H.: Die Pectine. Chemiker Ztg. **1941**, 461. — Bünning, E.: Über die Zellmembranen der Sphagnaceen. Beih. Bot. Zbl., **44**, 241 (1927). —

Christensen, H. R.: Mikrobiologische Untersuchungen von Hoch- und Niederungsmoortorf. Zbl. Bakter. II **37**, 414 (1913); Studien über den Einfluß der Bodenbeschaffenheit auf das Bakterienleben und den Stoffumsatz im Erdboden. B. Bedingungen der Cellulosezersetzung. Zbl. Bakter. II **43**, 105 (1915). — Czapek, F.: Zur Chemie der Zellmembranen bei den Laub- und Lebermoosen. Flora **86** (1899).

Daszewska, W.: Étude sur la désagrégation de la cellulose dans la Terre de Bruyère et de la Tourbe. Bull. Soc. bot. Genève, II. Sér., **4**, 255 (1911/12).

Engler, A.: Die natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten insbesondere der Nutzpflanzen. **10**, Musci, 2. Aufl. Leipzig: Engelmann 1924.

Fåhraeus, G.: Ann. Agr. Coll. Schweden **12** (1944). — Falck, R.: Über korrosive und destruktive Holzzersetzung und ihre biologische Bedeutung. Ber. dtsch. bot. Ges. **44**, 652 (1926). — Falck, R., u. W. Haag: Der Lignin- und Celluloseabbau des Holzes; 2 verschiedene Zersetzungsprozesse durch holzbewohnende Fadenpilze. Ber. dtsch. bot. Ges. **60**, 225 (1927). — Fernando, M.: Studies in the Physiology of Parasitism. XV. Effect of the Nutrient Medium upon the Secretion and Properties of Pectinase. Ann. Bot. N. S. **1**, 727 (1937), ref. Zbl. Bakter. II **100**, 350 (1939).

Gäumann, E., u. E. Böhni: Über adaptive Enzyme bei parasitischen Pilzen I. Helvet. chim. Acta **30**, 24 (1946); Über adaptive Enzyme bei parasitischen Pilzen II. Helvet. chim. Acta **30**, 1591 (1947). — Gutgisser, H. H.: Über aerobe Cellulosezersetzung durch Cytobacter polonicum. Zbl. Bakter. II **100**, 161 (1939).

Harding, H. A., W. J. Morse and L. R. Jones: The bacterial soft rots of certain vegetables. New York Agric. Exper. Stat. Techn. Bull. **1909**, Nr. 11, ref. Zbl. Bakter. II **27**, 648 (1911). — Holländer, St.: Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Wurzelpilzen saprophytisch lebender Orchideen. Diss. Würzburg 1932. — Horowitz-Wlassowa, L. M.: Zur Frage der aeroben Cellulosezersetzung. Zbl. Bakter. II **93**, 347 (1935/36). — Hwang, J., u. M. Frank: Untersuchungen über den Einfluß der Bodenreaktion auf die Ammonifikation und Nitrifikation in humusreichen Böden. Zbl. Bakter. II **99**, 97 (1938/39).

Iterson van, C.: Die Zersetzung von Cellulose durch aerobe Mikroorganismen. Zbl. Bakter. II **11**, 689 (1903/04). — Jansen, E. F., and L. R. Mac Donnel: Arch. Biochem. **8**, 97 (1945).

Karström, H.: Enzymatische Adaption bei Mikroorganismen. Erg. Enzymf. **7**, 350 (1938). — Kellermann, K. F., and I. G. Mc Beth: The Fermentation of Cellulose. Zbl. Bakter. II. **34**, 485 (1912). — Kertesz, Z. I.: J. Amer. chem. Soc. **61**, 2544 (1939). — Kondratjew, J. W.: Die Chemie der Torfbildner. I. Mitt. über Dioxanlignin. J. angew. Chemie **22**, 753 (1949), Moskau, Torf-Inst., ref. Chem. Zbl. **121**, 142 (1950). — Kondratjew, J. W., u. M. J. Kosstina: Über die Analysenmethode für pflanzliche Substanzen, Sphagnummoos (a) Eriophorum vaginatum (b), Kiefernholz (c). J. angew. Chemie **24**, 870 (1951), Moskau, ref. Chem. Zbl. **123**, 3712 (1952). — Korsakowa, M. P., and E. A. Nikitina: Decomposition of Pectinsubstances by Microorganisms. Bull. of the State Inst. of Agric. Microbiol. UdSSR, **5**, 37 (1933) [Russ. m. engl. Zusammenfassg.], ref. Zbl. Bakter. II **91**, 210 (1934/35). — Kroulik, A.: Über thermophile Cellulosevergärer. Zbl. Bakter. II **36**, 339 (1912).

Löhnis, F.: Vorlesungen über landwirtschaftliche Bakteriologie. 2. Aufl. Berlin: Borntraeger 1926; Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie. Bd. II: Dünger- und Bodenbakteriologie. Berlin: Borntraeger 1935. — Luh, B. S., and H. J. Phaff: Studies on Polygalacturonase of Certain Yeasts. Arch. Biochem. and Biophys. **33**, 212 (1951).

Makrinow, J. A.: Die aerobe Pectinstoffgärung. Zbl. Bakter. II **85**, 339 (1931/32); Über die Zersetzung des Torfes unter aeroben Bedingungen. Zbl. Bakter. II **89**, 201 (1933/34). — Marcusson, J.: Die Synthese der Humine und Huminsäuren. Ber. dtsch. chem. Ges. **54**, 542 (1921). — Z. angew. Chem. **38**, 339 (1925); **39**, 898 (1926). — Meyer, R.: Weitere Untersuchungen über den Abbau der Cellulose durch Bacillus cellulosae dissolvens Khouvine. Arch. Mikrobiol. **13**, 250 (1943).

Niethammer, A.: Weitere Beiträge über mikroskopische Bodenpilze. Arch. Mikrobiol. **13**, 60 (1942), ref. Zbl. Bakter. II **106**, 378 (1944/45).

Omelianski, W.: Über die Trennung der Wasserstoff- und Methangärung der Cellulose. Zbl. Bakter. II **11**, 369 (1904).

Phaff, H. J.: The Production of Exocellular pectic Enzymes by Penicillium chrysogenum. I. On the Formation and Adaptive Nature of Polygalacturonase and Pectinesterase. Arch. Biochem. **13**, 67 (1947). — Plank, N.: The Nature of Cellulose in Sphagnum. Amer. J. Bot. **33**, 335 (1946). — Pochon, J., et Y. T. Tchan: Précis de Microbiologie du Sol. Fermentation de la Cellulose. Monographies de l'Institut Pasteur 122 (1948). — Popowa, E.: Zur Gewinnung eines Pectinasepräparates aus Botrytis cinerea zur Klärung von Fruchtsäften. (Microbiology **4**, 247 [1935]), ref. Zbl. Bakter. II **94**, 358 (1936). — Pringsheim, H.: Z. physiol. Chem. **78** (1912). — Proskurjakow, N. J., u. F. M. Ossipow: Enzyma-

tische Spaltung der Pectine durch Schimmelpilze. Biochemie **4**, 50 (1939) [Russisch], ref. Zbl. Bakter. II **104**, 227 (1941/42).

Reese, E. T., and H. S. Levinson: A Comparative Study of the Breakdown of Cellulose by Microorganisms. Physiologia Plantarum **5**, Fasc. 3, 345 (1952) Copenhagen. — Rippel-Baldes, A.: Grundriß der Mikrobiologie. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952. — Rokitzka, A.: Allgemeine Mikrobiologie. München: C. Hansen 1949. — Rubentschik, L.: Über Sulfatreduktion durch Bakterien bei Cellulosegärungsprodukten als Energiequelle. Zbl. Bakter. II **73**, 483 (1928). — Rumjantzewa, L. A.: Die Schnelligkeit der Zersetzung von Cellulose verschiedener Herkunft unter dem Einfluß von Mikroorganismen. Microbiology, J. of gener. agricult. and ind. Microbiology **8**, part. 5, 571 (1939) Moskau-Leningrad [Russisch]. — Ruschmann, G., u. H. Bartram: Untersuchungen über den Verderb von Flachsfasern und Leinengarnen durch bakterielle und pilzliche Schädlinge. Zbl. Bakter. II **102**, 300 (1940). — Ruttner, F.: Grundriß der Limnologie. 2. Aufl., S. 191. Berlin: W. de Gruyter u. Co. 1952.

Simola, P. E.: Über den Abbau der Cellulose durch Mikroorganismen: I. Zur Morphologie und Physiologie der aeroben sporenbildenden Cellulosebakterien. II. Zur Chemie der Cellulosezersetzung durch die aeroben sporenbildenden Cellulosebakterien. Ann. Ac. Sc. Fenn. Serie A. **34**, Nr. 1 und 6 (1931), ref. Zbl. Bakter. II **86**, 89 (1932). — Sniezko, St.: Einige Versuche über aerobe Cellulosezersetzung durch Bakterien. A. Soc. Bot. Pol. **11**, 51 (1934), Zbl. Bakter. II **92**, 463 (1935). — Souci, S. W.: Die Chemie des Moores. Stuttgart: Enke 1938. — Stapp, C., u. H. Bortels: Mikrobiologische Untersuchungen über die Zersetzung von Waldstreu. Zbl. Bakter. II **90**, 28 (1934). — Strasburger, E.: Das Botanische Praktikum. Jena: Fischer 1939.

Waksman, S. A.: Chemical Composition of Peat and the Role of Microorganisms in the Formation. Amer. J. Sci. **19** (1930). — Decomposition of the various materials etc. of complex plant materials by pure cultures of fungi and bacteria. Arch. Mikrobiol. **2**, 136 (1931), ref. Zbl. Bakter. II **85**, 383 (1931/32). — Die Rolle der Mikroorganismen bei der Torfbildung. Z. „Brennstoff-Chemie", Essen **13**, 241 (1932). — Humus. Origine, Chemical Composition and Importance in Nature. Baltimore 1938. — Waksman, S. A., and I. J. Hutchings: Associative and antagonistic effects of microorganisms: III. Associative and antagonistic relationships in the decomposition of plant residues. Soil Sci. **43**, 77 (1937), ref. Zbl. Bakter. II **97**, 480 (1937/38). — Winogradsky, S.: Microbiologie du Sol. S. 407: Le Rouissage du Lin. S. 516: Sur la Dégradation de la Cellulose dans le Sol. Paris 1949. — Woodmann, H. E., and J. Stewart: The mechanism of cellulose-digestion in the ruminant organism. III. The action of cellulose-splitting bacteria on the fibre of certain typical feeding stuffs. J. Agricult. Sci. **22**, 527 (1932), Zbl. Bakter. II **87**, 491 (1932/33).

Zarembska: Aerobe Cellulosezersetzung durch Cellulobacillus varsaviensis. Zbl. Bakter. II **100**, 246 (1939).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 141—162 (1954).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Beitrag zur Kenntnis der Morphologie und Physiologie der Nektarhefe Candida Reukaufii (Grüss) Diddens et Lodder*.

Von

Hans Herbert Martin.

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. November 1953.)

E. Reukauf, der Entdecker der im Nektar vieler Blüten in einer charakteristischen „Kreuzform" vorkommenden Hefe *Candida Reukaufii*[1], hatte angenommen, daß die Blüten jeder Pflanzenart eine besondere Rasse dieser Hefe beherbergten, und hatte das auf die unterschiedliche Zusammensetzung des Nektars in den verschiedenen Blütenarten zurückgeführt. Die Existenz mehrerer Varianten von *C. Reukaufii* mit unterschiedlichen Eigenschaften konnte später auch von anderen Autoren beobachtet werden, allerdings nicht in der von Reukauf beschriebenen Weise. Grüss impfte einen aus *Linaria vulgaris* isolierten Stamm von *C. Reukaufii* in den hefefreien Nektar einer größeren Zahl anderer Pflanzenarten und konnte dadurch die typische Kreuzform der Hefe in allen Fällen gleich gut erhalten. Er schloß daraus, daß die verschiedenartige Zusammensetzung des Nektars bei den einzelnen Pflanzen keinen Einfluß auf die Ausbildung dieser seltsamen Zellform haben konnte.

Hautmann fand bei seinen Stämmen in Kultur 2 Rassen, die auf Würzeagar verschiedene Formen von Riesenkolonien bildeten und sich mikroskopisch dadurch unterschieden, daß die eine Rasse vorwiegend Einzelzellen bildete, während die andere in Form von Sproßbäumchen wuchs. Rippel u. Mitarb. (1948) berichteten über die Fähigkeit der Nektarhefe, in Lüftungskultur sehr üppig zu wachsen und große Mengen von Fett in der Zellmasse zu bilden. Spätere Versuche von Koch in halbtechnischem Maßstab haben bestätigt, daß *C. Reukaufii* einer der besten Fettbildner unter den heterotrophen Mikroorganismen ist.

Bei diesen Versuchen hatte sich aber gezeigt, daß bei weitem nicht alle *C. Reukaufii*-Stämme für eine Fettsynthese geeignet sind und man nur durch planmäßige Auslese aus einer größeren Zahl von Isolierungen zu einem technisch brauchbaren Fettbildner kommen kann. In diesem Zusammenhang schien es wichtig, weitere Kenntnisse über Biologie, Morphologie und Physiologie von *C. Reukaufii* zu sammeln und besonders die Beziehungen des Fettbildungsvermögens zu anderen Eigenschaften der Hefe (Gärvermögen, morphologische Merkmale) zu untersuchen.

* Auszug aus einer Dissertation der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen 1953.

[1] Unterfamilie *Cryptococcoideae* der anaskosporogenen Hefen. Vgl. Lodder u. Kreger-van Rij.

A. Versuchsmaterial und Methodik.

1. Isolierung der Stämme.

Aus den Blüten von 5 Pflanzenarten *(Lamium album, Glechoma hederacea, Salvia pratensis, Trifolium pratense, Linaria vulgaris)* wurden insgesamt 46 Stämme von *C. Reukaufii* gewonnen. Die geernteten Pflanzen wurden ins Laboratorium gebracht (bei Isolierung von weiter entfernten Standorten in Blechbüchsen mit feuchter Watte verpackt, um ein Eintrocknen des Nektars zu verhindern), und dann wurden direkt aus den Nektartropfen der Blüten mit dem Mikromanipulator einzelne Kreuzformen der Nektarhefe isoliert. Häufig konnten aus dem Nektar ein- und derselben Blüte mehrere solcher Ein-„Kreuzform"-Kulturen (die also praktisch Einzell-Kulturen darstellen), angelegt werden. Die aus ihnen hervorgegangenen Stämme sind im folgenden als „Schwesterstämme" bezeichnet. Die angewachsenen Isolierungen wurden auf Würzeagarschrägröhrchen übertragen und nach jeweils 3 Monaten auf neue Nährböden überimpft.



Abb. 1. Kreuzform aus frischer *Lamium album* Blüte, 450 ×.

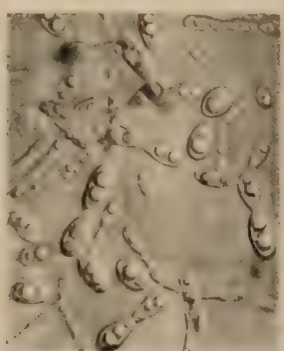


Abb. 2. *C. Reukaufii* aus verwelkender *Lamium album* Blüte, in der Natur gefunden, 450 ×

Abb. 1 zeigt Kreuzformen aus dem konzentrierten Nektar frischer Blüten. Wenn die Aufbewahrung der Pflanzen in den feuchten Büchsen bei weiterer Anreise vom Fundort zum Laboratorium länger als 3 Tage dauerte, hatte oft der Nektar aus der wasserdampfgesättigten Atmosphäre Feuchtigkeit angezogen und sich stark verdünnt. In solchem Nektar waren die typischen, schlanken Kreuzformen nicht mehr vorhanden; statt dessen fanden sich plumpe Kreuzformen, deren Zellen große Fetttropfen enthielten und ovale, fetthaltige Dauerzellen, die bisher nur in der Laboratoriums-Kultur beobachtet wurden. Später wurden auch im Freiland mehrfach Pflanzen gefunden, deren verwelkende, bräunlich verfärbte Blüten sehr reichlich Nektar enthielten, in dem dann nur noch verfettete Hefezellen vorhanden waren (Abb. 2). Somit wurde zum ersten Male die „Fettgeneration" von *C. Reukaufii* in der Natur aufgefunden (vgl. S. 159).

Im wasserklaren Nektar frischer Blüten ist das Wachstum von *C. Reukaufii* sehr schwach. Ein solcher Nektartropfen enthält in der Regel

nicht mehr als 10—20 grazile Kreuzformen, deren Vorhandensein nur mikroskopisch festgestellt werden kann. Im verdünnten Nektar welker Blüten dagegen ist die Vermehrung der Hefe so stark, daß sie schon makroskopisch durch eine deutliche Trübung des Nektartropfens zu erkennen ist.

2. Systematische Charakterisierung der isolierten Stämme.

Die bewährte und allgemein gebräuchliche Methodik zur Differentialdiagnose von Hefen ist in den Veröffentlichungen von Stelling-Dekker, Diddens u. Lodder, Lodder u. Kreger-van Rij sowie von Janke ausführlich beschrieben. Sie soll eine Trennung verschiedener Hefegattungen und Arten ermöglichen. Die Autoren verhehlen aber nicht, daß eine sinnvolle Definition der Begriffe „Gattung" und „Art" namentlich im künstlichen System der sporenlosen Hefen erhebliche Schwierigkeiten bereitet. Lodder u. Kreger-van Rij führten die systematische Umgrenzung der Art *C. Reukaufii* nach Untersuchung von 5 Stämmen durch. Nachuntersuchungen mit einer größeren Anzahl von eigenen Stämmen ergaben für einige Merkmale gute Übereinstimmung mit dem Typusstamm der holländischen Autorinnen. In anderen Eigenschaften zeigten meine Stämme jedoch sowohl untereinander als auch gegenüber dem Typusstamm erhebliche Abweichungen. Lodder u. Kreger-van Rij geben z. B. an: Gärvermögen von *C. Reukaufii* für Glucose, Fructose und Mannose positiv (bisweilen schwach). Unter den eigenen Stämmen wurden aber sowohl solche mit kaum meßbarer Gärkraft, als auch andere, die in ihrem Gärvermögen den echten Hefen gleichkommen, festgestellt.

Der Ausgangspunkt für alle weiteren Untersuchungen war daher die quantitative Messung des Gärvermögens sämtlicher isolierten Nektarhefestämme mit der „Mikroapparatur zur CO_2-Bestimmung in Gärversuchen" nach Myrbäck u. v. Euler.

In 4 Parallelansätzen je Hefestamm wurden jeweils 2 ml einer Lösung von 6% Zucker und 1% KH_2PO_4 in aqua dest. von einer Hefemenge entsprechend 50 mg Trockenmasse je Ansatz vergoren. Der Phosphatzusatz pufferte in allen Versuchen das Substrat auf ein von Myrbäck u. v. Euler als optimal ermitteltes End-p_H von etwa 4. Gärtemperatur 30° C. Die zur Gärung verwendete Hefe wurde gewonnen durch Vorkultur in einer synthetischen Nährlösung folgender Zusammensetzung: 6% Glucose (bzw. ein anderer Zucker); 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,1% KH_2PO_4; 0,05% $MgSO_4$; 5% Hefekochsaft; 1 γ% Aneurin; p_H 4,8. Jeweils 50 ml Nährlösung in 300 cm^3-Erlenmeyer-Kolben. Nach 3 Tagen Wachstum bei 25° C wurde die Hefe abzentrifugiert und nach viermaligem Waschen mit Leitungswasser und Zentrifugieren sofort in die Gäransätze gegeben.

Eine Selbstgärung, die bei Versuchen mit solchen relativ großen Hefemengen unter Umständen störend wirkt, konnte bei *C. Reukaufii* in Kontrollansätzen mit zuckerfreier Phosphatlösung nicht festgestellt werden. Demgemäß fiel auch die mikroskopische Jodprobe auf Glykogen, das Substrat der Selbstgärung, negativ aus.

Bei der Prüfung verschiedener Zuckerarten auf Vergärbarkeit durch *C. Reukaufii* mit den Stämmen 5_a, *8*, 25_a (siehe Tab. 1) in der Myrbäck-v. Eulerschen Apparatur wurden Glucose und Fructose am besten vergoren. Die von Talpai beschriebenen charakteristischen Unterschiede in der Geschwindigkeit der Vergärung von Glucose und Fructose bei Nektarhefen aus verschiedenen Blütenarten haben sich in eigenen

Tabelle 1. *Herkunft und Gärvermögen der isolierten C. Reukaufii-Stämme.*

Stamm-Nr.	Fundort und Zeit	Gärvermögen: cm^3 gebildetes CO_2 in 7 Std
	Blütengruppe *Lamium album*	
1	Donaueschingen Donauufer VIII. 1949	7,5
(2a;	Donaueschingen	5,2
2b)	Donauufer IX. 1950	7,3
3	Göttingen Garten des mikrobiolog. Instituts IX. 1949	9,1
(4a;	Göttingen	11,5
4b);	Garten des mikrobiolog.	9,7
4c	Instituts VI. 1950	8,9
(5a;	Hann.-Münden	12,3
5b);	Werraufer VI. 1950	2,7
(5c;		4,0
5d)		11,3
(6a;	Hoher Meißner	10,3
6b)	Straßenrand b. Bransrode VI. 1950	2,2
(7a;	Niemetal (Seitental der Weser) bei Bursfelde	6,0
7b)	Wegrand VI. 1950	10,5
	Blütengruppe: *Salvia pratensis*	
8	Donaueschingen Trockenwiese südl. der Stadt VIII. 1949	15,2
9a;	Donaueschingen	7,0
9b	Trockenwiese südl. der Stadt IX. 1950	8,8
10	Insel Reichenau Bodensee Trockenwiese VIII. 1949	4,1
11a;	Göttingen	10,3
11b	Botanischer Garten VI. 1950	15,0
(12a;	Lenglern b. Göttingen	8,3
12b)	Trockenwiese VI. 1950	5,1

Stamm-Nr.	Fundort und Zeit	Gärvermög cm^3 gebild CO_2 in 7 S
	Blütengruppe: *Trifolium pratens*	
15	Göttingen Garten des mikrobiolog. Instituts X. 1949	5,6
(16a;	Göttingen	6,0
16b)	Garten des mikrobiolog. Instituts VIII. 1950	8,9
17	Speyer Rheinufer IX. 1949	3,3
18	Donaueschingen Donauufer VIII. 1949	7,2
19	Niemetal Wegrand bei Bursfelde VI. 1950	3,6
	Blütengruppe: *Linaria vulgaris*	
20	Göttingen Garten des mikrobiolog. Instituts X. 1949	4,4
(21a;	Göttingen	8,3
21b)	Botanischer Garten VIII. 1949	11,1
(22a;	Nikolausberg	4,7
22b)	Wegrand b. Göttingen VIII. 1950	5,2
(23a;	Donaueschingen	7,5
23b;	Buchberg Waldlichtung	7,6
23c)	IX. 1950	8,9
	Blütengruppe: *Glechoma hederacea*	
(24a;	Göttingen	7,7
24b)	Garten des mikrobiolog. Instituts V. 1950	5,6
(25a;	Nikolausberg	10,0
25b;	Wegrand b. Göttingen	10,4
25c)	V. 1950	7,5
(26a;	Hoher Meißner	8,5
26b)	Straßenrand b. Bransrode VI. 1950	3,6
(27a;	Niemetal	2,2
27b)	Wegrand bei Bursfelde VI. 1950	3,7

Versuchen nicht reproduzieren lassen. Die beiden Monosaccharide wurden von allen Stämmen etwa gleich schnell vergoren. Nach Vorkultur der Hefe in einer glucosehaltigen Nährlösung konnte für Maltose und Saccharose keine nennenswerte Vergärung festgestellt werden. Durch Vorkultur in einer Saccharosenährlösung ließ sich aber die Vergärbarkeit von Saccharose beträchtlich steigern (Abb. 3), während eine ähnliche Stimulierung der Maltosevergärung durch Vorkultur der Hefe auf Maltose nicht eintrat.

Es ist merkwürdig, daß bei vielen Stämmen von *C. Reukaufii* die Gärung sehr bald zum Stillstand kommt.

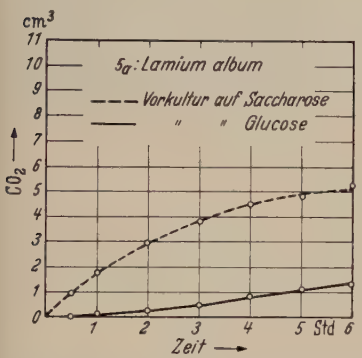


Abb. 3. Vergärung von Saccharose durch *C. Reukaufii*, Stamm 5_a, ----- nach Vorkultur in Saccharose-haltiger Nährlösung; —— nach Vorkultur in Glucose-haltiger Nährlösung.

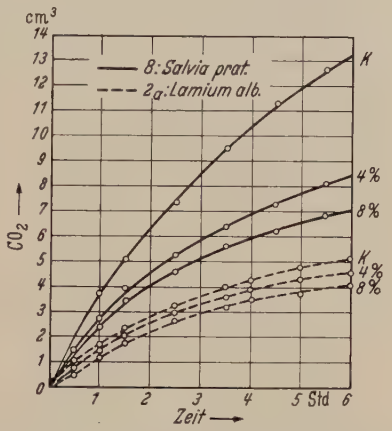


Abb. 4. Einfluß von Äthylalkohol auf die Gärung von *C. Reukaufii*. *K*: Kontrolle ohne Alkoholzusatz; 4%: Zusatz von 4% Alkohol zum Gärsubstrat; 8%: Zusatz von 8% Alkohol zum Gärsubstrat. Gärlösung: 6% Glucose, 1% KH_2PO_4, Aqua dest.

In der Literatur ist Gärungshemmung durch mehrere Faktoren beschrieben. Nach Hesse verzögert der entstehende Alkohol schon in einer Konzentration von 0,7% die Gärung von *Bierhefe*. Stärkere Hemmung tritt ein bei 4—5%, Stillstand der Gärung bei 10—12% Alkohol. Sauerstoffliebende Wuchshefen wie *Mycoderma* und *Torulopsis utilis* sind nach Haehn besonders empfindlich gegen Alkohol. Andere Einflüsse wie Säurebildung und CO_2-Anreicherung haben geringere Bedeutung.

In Abb. 4 ist die Wirkung steigender Alkoholmengen auf die Gärung von 2 Stämmen der Nektarhefe dargestellt. Erstaunlicherweise wird die Gärung von *C. Reukaufii* durch diese hohen Alkoholkonzentrationen nicht zum Erliegen gebracht. Es ist sogar bei dem schwach gärenden Stamm 2_a die relative Hemmung der Gärung bei Zusatz von 8% Alkohol bedeutend geringer (21,6%) als bei dem gut gärenden Stamm *8* (47,4%). Der Gärungsalkohol kann also nicht die Ursache für den raschen Abfall der Gärgeschwindigkeit bei vielen Stämmen der Nektarhefe sein.

In Tab. 1 sind die Ergebnisse der Gärversuche mit Glucose zusammengefaßt. Die Stämme sind geordnet nach den Blütenarten, aus denen

sie kommen. Eine solche Einheit wird jeweils als Blütengruppe bezeichnet. Innerhalb einer Blütengruppe gehören die Stämme, die am gleichen Datum vom gleichen Standort isoliert wurden, zu ein und derselben Ziffer der laufenden Nummerierung und sind durch Indices voneinander gekennzeichnet. Die Schwesterstämme, die aus einer Blüte kommen, stehen in Klammern beieinander.

Ergänzend zu Tab. 1 zeigt Abb. 5 anschaulich, daß innerhalb der Art *C. Reukaufii* bei verschiedenen Stämmen erhebliche Unterschiede im

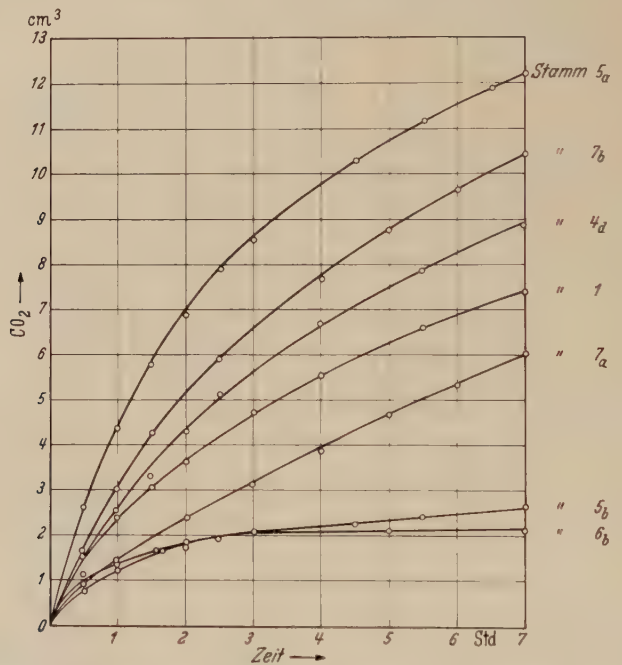


Abb. 5. Vergärung von Glucose durch verschiedene Stämme von *C. Reukaufii* aus Blüten von *Lamium album*.

Gärvermögen bestehen. Ein bevorzugtes Auftreten einer besonders guten oder schwachen Gärfähigkeit in einer bestimmten Blütengruppe kann nicht beobachtet werden. Ebensowenig ist etwa eine Übereinstimmung in den Gäreigenschaften bei Stämmen vorhanden, die von einem gemeinsamen Standort isoliert wurden. Das ist nicht verwunderlich angesichts der Tatsache, daß mehrere Schwesterstämme vorliegen, die extreme Unterschiede im Gärvermögen aufweisen; z. B. die Stämme (*5a; 5b*), (*5c; 5d*) und (*6a; 6b*) in Tab. 1; zu (*5a; 5b*) siehe auch Abb. 5.

Mikroskopisch konnte in den Gäransätzen ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Zellform und dem Gärvermögen wahrgenommen werden. Als Beispiel mögen die beiden Schwesterstämme (*5a; 5b*) dienen.

Gut gärende Stämme liegen in Form von Hefesproßverbänden und kreuzformähnlichen Zellgruppen vor: Stamm *5a*, Abb. 6. Die schwach gären-

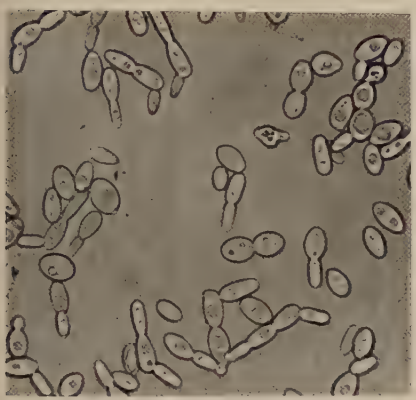


Abb. 6. Stamm 5_a; guter Gärer.

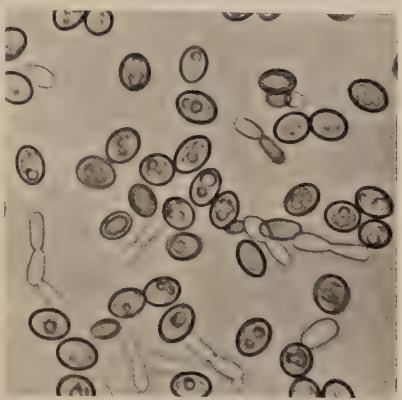


Abb. 7. Stamm 5_b; schwacher Gärer.

Zellen aus Gäransätzen, 450 ×.

Tabelle 2.

Differenzierungsschema zweier Stämme mit gutem bzw. schlechtem Gärvermögen.

	Stamm *5a* gutes Gärvermögen.	Stamm *5b* schwaches Gärvermögen.	Diagnose von Lodder u. Kreger-van Rij.
Bildung von Pseudomycel auf Objektträgerkulturen.	Gute Ausbildung von Pseudomycel Abb. 8.	Vorwieg. Bildung von großen ovalen Einzelzellen Abb. 9.	Pseudomycel nicht sehr üppig, Kreuzform nur selten beobachtet.
Form und Größe der Zellen in Bierwürze nach 2 Tagen bei 25° C. Bildung von Hefering, Haut und Bodensatz in Bierwürze.	Ellipt. Zellen, einzeln oder in kleinen Sproßverbänden (3,2—6,4) × (6,4—12,8) μ. Nach 14 Tagen Bodensatz und schwacher Hefering.	Ovale Einzelzellen mit Fetttropfen, daneb. kl. ellipt. Zellen in kurzen Sproßverbänden (8—9,6) × (11,8—13) μ. Nach 8 Tagen Bodensatz u. Ring, nach 14 Tagen starker Hefering u. Haut.	Zellen lang bis langoval (3—5,5) × (7,5—13) μ. Bodensatz u. Ring werden gebildet.
Aussehen von Strichkulturen auf Würzeagar nach 1 Monat bei 17° C.	Farbe hellbräunlich, Querschnitt des Lagers flach; Rand feingekerbt, Oberfläche glatt mit vielen bräunlichen Einsprengseln, matt glänzd.	Farbe hellcremegelb, Querschnitt des Lagers gewölbt, Rand gewellt, Oberfläche glatt ohne Glanz.	Farbe gelblich, weiche Konsistenz, über die ganze Ob.-fläche fein gekräus., matt glänzd., Rand gelappt.

den Stämme dagegen bilden in der Mehrzahl ovale Einzelzellen nach Art der Dauerzellen, teilweise mit schwacher Fettbildung: Stamm *5b*, Abb. 7.

An diesen beiden Stämmen soll nun auch gezeigt werden, welche weiteren Unterschiede sich zwischen gut gärenden und schwach gärenden Nektarhefen bei Anwendung des Differenzierungsschemas nach Lodder u. Kreger-van Rij ergeben (Tab. 2). Bezüglich der Methodik verweise ich auf diese Autorinnen.



Abb. 8. Stamm *5a*; guter Gärer.



Abb. 9. Stamm *5b*; schwacher Gärer.

Zellformen auf Objektträgerkulturen, 450 ×. Kartoffelwasser-Glucose-Agar.

Bei den übrigen Untersuchungen stimmen meine Befunde für alle geprüften Stämme mit der Diagnose von Lodder u. Kreger-van Rij überein.

Zuckerassimilation nach der Beijerinckschen auxanographischen Methode: Glucose, Fructose, Mannose, Galaktose, Maltose, Saccharose: positiv; Lactose: negativ. — Stickstoffassimilation nach Beijerinck: KNO_3: negativ; $(NH_4)_2SO_4$, Harnstoff, Asparagin, Pepton: positiv. — Äthylalkohol als Kohlenstoffquelle: nach 7 Tagen bei 25° C kein Wachstum. — Spaltung des Glykosids Arbutin: positiv.

B. Weitere Untersuchungen.

1. Beobachtungen an Würzeagarkulturen.

Die Durchmusterung der Würzeagar-Strichkulturen von sämtlichen Stämmen zeigte, daß sich diese alle mehr oder weniger eindeutig einer der oben beschriebenen Wuchsformen zuordnen lassen, dem bräunlichen, flachen oder dem cremefarbigen, gewölbten Typus. Auch mikroskopisch sind deutliche Unterschiede festzustellen. Die cremefarbigen Kulturen bestehen zum größten Teil aus großen, ovalen, fetthaltigen Dauerzellen, deren Maße (8—11,4) × (10—15) μ von Stamm zu Stamm schwanken. Wahrscheinlich verursacht die Bildung der voluminösen Fettzellen die gewölbte Form der Kultur.

Die bräunlichen, flachen Kulturen bestehen durchweg aus Hefesproßzellen von sehr wechselnder Größe und Gestalt in wenig- bis viel-

zelligen Sproßverbänden, doch enthalten auch diese Kulturen in geringer Menge fetthaltige Dauerzellen. Würzeagar scheint das optimale Milieu für die Dauerzellenbildung zu sein, wenn diese von dem betreffenden Stamm überhaupt gebildet werden können. Das Verhalten von Stamm *8* aus *Salvia pratensis* weist deutlich auf die Funktion der Fettzellen als Überdauerungsorgane hin. Dieser Stamm bildete als einziger in der ganzen Sammlung in keinem Medium Dauerzellen und mußte jeweils nach längstens 6 Wochen auf neuen Nährboden übertragen werden, um lebensfähig zu bleiben, während alle anderen Stämme noch in 6 Monate alten Würzeagarkulturen keimfähige Dauerzellen enthielten.

In den Würzeagarkulturen mehrerer Stämme wurde Sektorbildung beobachtet, eine Erscheinung, die nach Diddens u. Lodder bei den *Mycotoruloideae*[1] recht häufig vorkommt. Sie trat vor allem bei den cremefarbigen, fettzellhaltigen Stämmen auf, und zwar in der Form, daß von der Grundmasse des Hefelagers aus ein etwas erhabener, bräunlicher, schleimigglänzender Streifen deltaförmig auf den unbewachsenen Agar hinauswuchs. Hier muß nochmals betont werden, daß alle Stämme, auch die sektorierten, von Einzell-Kulturen abstammten. Mikroskopisch wurden in dem normalen Teil der Hefemasse fast ausschließlich Dauerzellen festgestellt, während die Sektoren aus kleinen, elliptischen, fettfreien Zellen bestanden.



Abb. 10. Dauerzellen mit häutigen Anhängseln aus sektorierten Würzeagarkulturen von *C. Reukaufii*, 630 ×.

In den sektorierten Agarkulturen, und zwar in dem die Fettzellen enthaltenden Teil, wurden regelmäßig große, alte Dauerzellen beobachtet[2], die nur noch einen kleinen oder gar keinen Fetttropfen besaßen und an ihrer Membran eingerollte, häutige Anhängsel trugen (Abb. 10). Über die Bildung und Bedeutung dieser Gebilde konnte vorerst nichts näheres festgestellt werden, doch sei in diesem Zusammenhang auf die Arbeiten von Windisch hingewiesen, der bei *Candida pulcherrima* und *C. tropicalis* ganz ähnliche Erscheinungen beobachtet und sie als „Ascusbildung" (leere Asci) gedeutet hat.

Bei einigen sektorierten Stämmen wurden mit Hilfe des Mikromanipulators von den typischen Zellformen der Sektoren und des ursprünglichen Hefelagers Einzell-Kulturen angelegt. Die neuen Sektorstämme behielten zwar auf Würzeagar über viele Abimpfungen hinweg ihre typischen makro- und mikroskopischen Eigenschaften, bei Anwendung der oben beschriebenen Differenzierungsmethodik zeigte sich aber, daß sich diese Stämme nicht qualitativ, sondern nur quantitativ mehr oder weniger stark voneinander unterschieden; mit anderen Worten: es war nicht möglich, aus ein und derselben sektorierten Kultur durch Einzell-

[1] *Mycotoruloideae* = *Cryptococcoideae*.

[2] Sie wurden auch bei anderen Kulturen unter den Fettzellen gefunden, hier jedoch immer nur vereinzelt.

Isolierung einerseits gut gärende Stämme mit Pseudomycelbildung und andererseits schwach gärende Stämme mit reichlicher Bildung fetthaltiger Dauerzellen und fehlendem Pseudomycel zu erhalten. Auf eine ausführliche Darstellung dieser Versuche kann daher verzichtet werden.

2. *Wachstumsversuche.*

Das wichtigste Ergebnis der bisherigen Untersuchungen ist die Feststellung, daß 2 verschiedene Typen von *C. Reukaufii* vorkommen, von denen der eine einen vorwiegend anaeroben Gärungsstoffwechsel durchführt, während der andere nur schwach gärt und vorwiegend aerob atmet. Es war daher von vornherein zu erwarten, daß bei Wachstum unter aeroben Bedingungen und vor allem in Lüftungskultur die schwach gärenden Stämme den guten Gärern überlegen sein mußten, d. h. der Ökonomische Koeffizient, Ö.K. = die je 100 g verbrauchter Kohlenstoffquelle (Glucose) gebildete Hefetrockenmasse (cf. Rippel, 1952), mußte bei Stämmen mit schwacher Gärkraft höher sein als bei gut gärenden Nektarhefen, da ja die Atmung energetisch bedeutend ergiebiger ist als die alkoholische Gärung.

Kaufmann hat den Ö.K. der ausgesprochenen Gärhefe *Frohberg* mit dem der schwach gärenden Wuchshefe *Torulopsis utilis* verglichen. Unter anaeroben Verhältnissen hatten beide Hefen einen etwa gleich niedrigen Ö.K. zwischen 5 und 7. Bei aeroben Versuchsbedingungen konnte Hefe *Frohberg* ihren Ö.K. nicht wesentlich erhöhen, während der Ö.K. von *T. utilis* auf das sechsfache des anaeroben Wertes stieg. Kaufmann verweist auf die Befunde von Meyerhof, wonach untergärige Bierhefen wegen der Unvollkommenheit ihres Cytochromsystems auch bei stärkster Belüftung und nach Anpassung an aerobe Verhältnisse nur $^1/_5$ des gebotenen Zuckers veratmen können und $^4/_5$ auch unter diesen Bedingungen vergären.

Auch das Ausmaß der Fettbildung in der Zelle ist in ähnlicher Weise wie der Ertrag von der Größe des aeroben Stoffwechsels abhängig. Die Bedeutung einer guten Sauerstoffversorgung für die mikrobiologische Fettsynthese ist von vielen Autoren festgestellt worden (Naegeli u. Loew; Lindner; für *C. Reukaufii* durch Rippel 1948). Man konnte also annehmen, daß die gut gärenden Nektarhefen auch hinsichtlich der Fettbildung hinter den schwach gärenden und vorwiegend aerob atmenden Stämmen zurückbleiben würden. Schon die morphologischen Beobachtungen an den Zellen der Gärvorkulturen gaben hierfür Anhaltspunkte (Abb. 6 und 7).

Es ist einleuchtend, daß man an Hand des Ökonomischen Koeffizienten allein den Nutzeffekt des Wachstums verschiedener Hefestämme nicht vergleichen kann, wenn sich diese in der Zusammensetzung ihrer Zellsubstanz (d. h. vor allem in ihrem Fett- und Eiweißgehalt) wesentlich voneinander unterscheiden, denn die relativen kalorischen Werte der 3 wichtigsten Zellbausteine Kohlenhydrat (1), Eiweiß (1,7) und Fett (2,5) sind sehr verschieden. Von 2 Stämmen mit gleichem Ö.K. würde also der fettreichere von beiden in Wirklichkeit die gebotene Kohlenstoffquelle mit einem höheren Nutzeffekt verwertet haben als die fettärmere. Es wurde deshalb in den folgenden Versuchen neben dem Ö.K.

aus den Ergebnissen der Fett- und Eiweißbestimmungen auch noch der „Kalorische Koeffizient" (K.K.) der Hefe berechnet in Anlehnung an Rippel (1940). Der Ökonomische Koeffizient läßt sich zerlegen in 3 Bestandteile:

1. Fettkoeffizient (F.K.) — je 100 g verbrauchter Glucose gebildetes Fett in g (Rippel, 1940);
2. Eiweißkoeffizient (E.K.) = je 100 g verbrauchter Glucose gebildetes Eiweiß in g (Rippel u. Nabel, 1939);
3. Ökonomischer Koeffizient minus Summe von Fett- und Eiweißkoeffizient = je 100 g verbrauchter Glucose gebildetes Hefe-Kohlenhydrat in g.
(Der nicht bestimmte Aschenanteil bleibt unberücksichtigt.)

Multipliziert man nun die 3 Fraktionen des Ö.K. mit den zugehörigen, oben angegebenen kalorischen Werten, so ergibt die Summe der Produkte den Kalorischen Koeffizienten (K.K.) der gesamten Hefetrockenmasse. Dieser Wert gibt an, wieviel Prozent der kalorischen Energie aus der verarbeiteten Glucose in die gebildete Hefemasse eingegangen ist. Der Kalorische Koeffizient ist demnach nicht identisch mit dem „Wahren Nutzwert" oder „Rubner-Koeffizienten", bei dem nicht nur der Energiegehalt der Zellmasse, sondern auch der etwa gebildeter, energiereicher Stoffwechselprodukte wie Äthylalkohol usw. ins Verhältnis gesetzt wird zum Energiegehalt der verbrauchten Kohlenstoffquelle.

3. Methodik der Lüftungsversuche.

Zusammensetzung der Nährlösung: In der umfangreichen Literatur über die mikrobiologische Fettsynthese wird übereinstimmend berichtet, daß Eiweißaufbau und Fettbildung gegensinnig verlaufende Stoffwechselvorgänge sind. Unter Bedingungen, die eine reichliche Eiweißbildung erlauben (gute Stickstoffernährung), erzeugt die Mikroorganismenzelle wenig Fett, während alle Eingriffe, welche die Proteinsynthese beeinträchtigen (vor allem Stickstoffmangel) die Fettbildung fördern (Rippel u. Mitarb., 1948; Heide; Fink, Haeseler u. Schmidt; Damm, 1943; Schulze). Größtmögliche Wachstumsökonomie und Eiweißbildung einerseits und gute Fettbildung andererseits konnten daher bei *C. Reukaufii* nicht unter den gleichen Ernährungsbedingungen erwartet werden. Es wurden deshalb 2 Versuchsreihen angesetzt:

1. Lüftungskultur mit reichlicher Stickstoffversorgung zur Erzielung eines hohen Ö.K. und Eiweißgehaltes. *Kulturhefen* und *Torulopsis utilis* bilden bei guter Stickstoffernährung etwa 50% Eiweiß i. Tr. (Haehn). Nach Nielsen liegt das Maximum des Eiweißgehaltes von Hefe bei 76%, das Minimum bei 15%. Für *C. Reukaufii* wurde unter der Annahme eines Ö.K. von 30 und einer Kohlenstoffgabe von etwa 6% Glucosemonohydrat für einen angestrebten Eiweißgehalt von 50% i. Tr. ein Stickstoffbedarf von 0,132 g N_2 je 100 ml Nährlösung errechnet, zu dessen Deckung eine Gabe von 0,28 g Harnstoff je 100 ml nötig war.

Die Stickstoffkonzentration für Versuchsreihe 1 betrug 0,35% Harnstoff.

2. Lüftungskultur unter Stickstoffmangel zur Erzielung eines hohen Fettgehaltes mit einer Harnstoffgabe, die eine Bildung von nur 16% Eiweiß i. Tr., also etwa das von Nielsen angegebene Minimum, erlauben sollte. Bei diesen Versuchen wurde ein etwas niederer Ö.K. erwartet wegen des größeren Anteils von kalorisch hochwertigem Fett an der Hefetrockenmasse. Bei einem angenommenen Ö.K. von 25 und einer Konzentration von etwa 6% Glucosemonohydrat in der Nährlösung

ergab sich ein Bedarf von 0,035 g Stickstoff bzw. 0,075 g Harnstoff je 100 ml Nährlösung.

Die Stickstoffkonzentration für Versuchsreihe 2 betrug 0,075% Harnstoff.

Dabei war zu beachten, daß eine Hemmung der Eiweißbildung nicht nur durch unzureichende Stickstoffernährung verursacht wird, sondern auch durch Mangel an Phosphat, das als Baustein phosphorhaltiger Nucleinsäuren eine zentrale Rolle bei der Proteinsynthese spielen soll (Damm, 1950). Nach Schulze enthält Eiweißhefe etwa 4% P_2O_5 i. Tr. und Fetthefe 0,6—1% P_2O_5 i. Tr. Der Phosphatgehalt der Nährlösung mußte also so hoch bemessen werden, daß er einen P_2O_5-Gehalt der Trockenhefe von mindestens 4% ermöglichte. Für Ö.K. 30 und 6% Glucosemonohydrat in der Nährlösung wurde als ausreichende Phosphatgabe berechnet ein Gemisch aus 0,14 g KH_2PO_4 und 0,07 g K_2HPO_4 je 100 ml Nährlösung.

Grundnährlösung der Lüftungsversuche: 6% Glucosemonohydrat; 0,14% KH_2PO_4; 0,07% K_2HPO_4; 0,1% $MgSO_4$; Spur NaCl; Wuchsstoffe; aqua dest.; p_H 6,2. Sterilisation ½ Std bei 1,2 atü. — Je Ansatz 200 ml Nährlösung. Kulturgefäße: Zylindrische 1 l-Hefebelüftungsapparate von Schott u. Gen. Als Antischaummittel hat sich Silicon (100 mg/200 ml Nährlösung) sehr bewährt. — Impfmaterial: Suspensionen von 4 Tage alten Würzeagarkulturen in sterilem Wasser, je Lüftungskolben die Abschwemmung von 2 Agarschrägröhrchen.

Während des Wachstums trat infolge des schwachen Pufferungsvermögens der synthetischen Nährlösung beträchtliche Säurebildung und Schädigung der Zellen ein. Es wurde deshalb der p_H-Wert laufend kontrolliert und durch Zusatz von gesättigter Sodalösung auf etwa p_H 5,8 gehalten.

Die gebildete Hefe wurde abzentrifugiert und nach mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser in vorgewogenen Zentrifugengläsern bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. — Die Bestimmung des Fettgehaltes in der Hefetrockenmasse erfolgte nach Geffers durch Aufschluß der Hefe mit starker, kochender Salzsäure und Ausschütteln der Lipoide mit Äther-Petroläther. — Zur Eiweißbestimmung wurden die Werte der Kjeldahl-Stickstoffbestimmungen mit 6,25 multipliziert. — Die Zuckerbestimmungen in den Nährlösungen wurden nach der Methode von Lehmann-Maquenne-Schoorl durchgeführt.

Die Ergebnisse wurden durch Anstellung von jeweils mindestens 3 Parallelversuchen gesichert.

4. Der Wuchsstoffbedarf von C. Reukaufii.

In einer synthetischen Nährlösung ohne Zusatz von Vitaminen zeigt die Nektarhefe kein nennenswertes Wachstum.

Rippel u. Mitarb. (1948) verwandten bei ihren Fettbildungsversuchen mit dieser Hefe komplexe Wuchsstoffe in Form von Hefe- und Pflanzenextrakten und Molke. Die Autoren wiesen auf den hohen Wuchsstoffbedarf der Hefe hin und vermuteten als wirksame Substanz hauptsächlich Biotin, was sie damals wegen kriegsbedingter Schwierigkeiten nicht exakt nachprüfen konnten. Aneurin in einer Konzentration von 100 γ/100 ml Nährlösung war wirkungslos. Hijner untersuchte den Wuchsstoffbedarf von *C. Reukaufii* in synthetischer Nährlösung mit reinen Vitaminen. Danach ist Biotin unerläßlicher Wachstumsfaktor; Aneurin steigert den Ertrag auch noch nach Erreichen maximalen Wachstums durch Biotin, ist aber allein ohne Wirkung. Ein weiterer synergistisch wirkender Faktor ist m-Inosit. Supraoptimale Konzentrationen dieser Wuchsstoffe für die Nektarhefe sind nach Hijner jeweils 48 mγ Biotin; 48 γ Aneurin; 2,4 mγ m-Inosit je 100 ml Nährlösung.

Bei eigenen Versuchen war m-Inosit nur von geringer Wirkung; bei Biotin dagegen hat sich durch eine Erhöhung der Konzentration auf das

Mehrfache des oben angegebenen Wertes eine beträchtliche Zunahme des Ertrages erreichen lassen. Tab. 3 zeigt den Einfluß steigender Biotinmengen auf das Wachstum von *C. Reukaufii*, Stamm *17*, bei konstanter Aneurinkonzentration.

Danach werden bis zu einer Biotinkonzentration, die das 5fache der von HIJNER angegebenen Menge beträgt, Wachstumsgeschwindigkeit, Ö.K. und K.K. stark gefördert, in der Hauptsache durch vermehrte

Tabelle 3. *Einfluß der Biotinkonzentration auf das Wachstum von C. Reukaufii.*

Wuchsstoffe je 100 ml Nährlösung	ohne Wuchsstoff	50 γ A	50 γ A 0,05 γ B	50 γ A 0,25 γ B	50 γ A 1,25 γ B	1,25 γ B
Lüftungsdauer Stunden	84	65	65	65	45	50
Glucoseverbr. g/100 cm³	0,554	1,76	2,50	3,87	5,50	5,41
Trockenhefe g/100 cm³	0,059	0,403	0,542	1,062	1,675	2,025
Ö.K.	10,6	23,0	21,7	27,5	30,4	37,5
Fett % i. Tr.	—	8,6	8,1	9,2	13,8	11,1
Fettkoeffizient	—	2	1,8	2,5	4,1	4,2
Eiweiß % i. Tr.	—	12,5	10,6	37,2	38,8	40,2
Eiweißkoeffiz.	—	2,9	2,3	10,2	11,8	15
K.K.	—	28	26	38,5	44,8	54,3

Nährlösung 1, A = Aneurin, B = Biotin.

Eiweißbildung. Mit Aneurin allein erfolgt zwar auch eine deutliche Wachstumssteigerung gegenüber der Kontrolle, doch wird es sich hier vermutlich um einen Synergismus handeln zwischen Aneurin und der geringen Menge Biotin, die in der Anstellhefe (etwa 25 mg Trockenmasse/100 cm³) enthalten war. Überraschend ist das Ergebnis des Ansatzes, der 1,25 γ Biotin/100 cm³ als einzigen Wuchsstoff enthielt. Ö.K. und K.K. sind stark erhöht gegenüber der Kultur, bei der neben der gleichen Menge Biotin auch noch 50 γ Aneurin/100 cm³ gegeben wurde, so daß eher der Eindruck einer Hemmung als einer Förderung durch Aneurin entsteht. Der nächste Versuch: Steigerung der Aneuringabe bei konstanter Biotinkonzentration bestätigt diese Vermutung (Tab. 4).

Bei den Lüftungskulturen mit Aneurinzusatz war in der durchgeblasenen Luft stets ein deutlicher Alkoholgeruch wahrnehmbar, der in den Ansätzen ohne Aneurin viel schwächer war oder völlig fehlte. Es ist anzunehmen, daß beim Fehlen von Aneurin, das ja die prostethische Gruppe der Decarboxylase ist, die Alkoholgärung, die wie oben erörtert, auch in der Lüftungskultur mit einem gewissen Anteil am Stoffwechsel beteiligt ist, eingeschränkt wird, wodurch die Kohlenstoffquelle mehr

Tabelle 4. *Einfluß der Aneurinkonzentration auf das Wachstum von C. Reukaufii.*

Wuchsstoffe je 100 ml Nährlösung	1,25 γ B	1,25 γ B 5 γ A	1,25 γ B 25 γ A	1,25 γ B 50 γ A
Lüftungsdauer (Std) . .	54	54	46	46
Glucoseverbrauch g/100 cm³	5,5	5,5	5,5	5,5
Trockenhefe g/100 cm³	2,029	2,046	1,801	1,786
Ö.K..	36,9	37,2	32,8	32,4
Fett % i. Tr.	10,9	10,2	11,9	12,7
Fettkoeffizient	4	3,2	3,9	4,1
Eiweiß % i. Tr.	38,9	39,2	37,6	36,9
Eiweißkoeffizient . . .	14,4	14,6	12	12
K.K.	53	53,1	46,1	47

Nährlösung 1, A = Aneurin, B = Biotin.

oder weniger vollständig für die energetisch günstigere, aerobe Atmung verfügbar wird.

Trotzdem wurde weiterhin auf eine Aneuringabe nicht verzichtet, weil dieser Wuchsstoff offenbar einen fördernden Einfluß auf die Fettbildung und die Geschwindigkeit des Wachstums hat. Die Wuchsstoffkonzentrationen für die folgenden Versuche betrugen 1,25 γ Biotin, 50 γ Aneurin und 1 γ m-Inosit je 100 ml Nährlösung.

5. Wachstum, Fett- und Eiweißbildung bei gut gärenden und schwach gärenden Stämmen von C. Reukaufii.

Für diese Versuche wurden aus allen Blütengruppen die Stämme mit dem besten und dem schwächsten Gärvermögen herausgesucht (vgl. Tab. 1). Tab. 5 zeigt die Ergebnisse für jeweils 2 Stämme der gleichen Gruppe. Fetthaltige Dauerzellen werden von den gut gärenden Stämmen in Lüftungskultur nie gebildet, während sie in den Ansätzen der schwachen Gärer sowohl bei hoher als auch bei niedriger Stickstoffgabe immer vorhanden sind (Abb. 11 u. 12).

Aus diesen Ergebnissen läßt sich eine Reihe bemerkenswerter Gesetzmäßigkeiten ableiten, die an dem Beispiel zweier besonders typischer Stämme erläutert werden sollen. Bei Stamm *26*$_b$ liegt offenbar der Extremfall eines schwachen Gärers und guten Fettbildners vor (Tab. 6). Bei niedriger Stickstoffgabe erzeugt der Stamm bei sehr guter Wachstumsökonomie eine fettreiche und eiweißarme Hefe. Durch Erhöhung der Stickstoffnahrung wird die Fettbildung vermindert und die Eiweißbildung vermehrt, aber nur bis zu einem offenbar maximalen Wert (26% Eiweiß in d. Tr.), der schon bei 0,35% Harnstoff in der Nährlösung

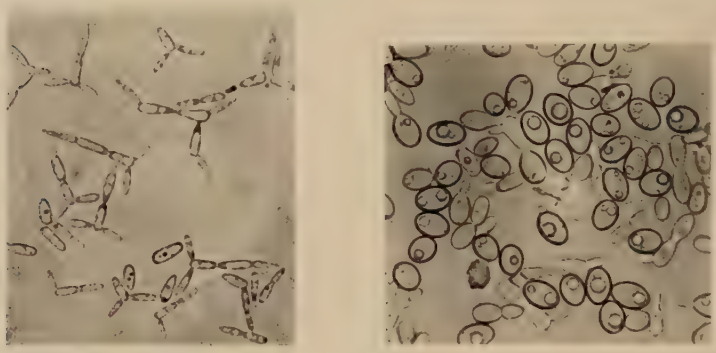
Tabelle 5. *Wachstum, Fett- und Eiweißbildung.*

	Stamm 5_a gutes Gärvermögen		Stamm 5_b schwaches Gärvermögen		Stamm 11_b gutes Gärvermögen		Stamm 12_b schwaches Gärvermögen	
	Blütengruppe Lamium album				*Blütengruppe Salvia pratensis*			
Harnstoffgabe	0,35%	0,075%	0,35%	0,075%	0,35%	0,075%	0,35%	0,075%
Lüftungsdauer Stunden	45	61	45	61	40	52	45	61
Glucoseverbr. g/100 cm³	5,2	5,48	5,2	5,48	5,1	5,4	5,2	5,5
Trockenhefe g/100 cm³	1,351	1,518	1,515	2,286	1,272	1,414	1,711	1,868
Ö.K.	26	27,6	29,2	41,8	25	25,2	32,9	34
Fett % i. Tr.	4,5	7,5	9,1	20,6	3,6	9,2	14,5	20
Fettkoeffizient	1,2	2,1	2,7	8,6	0,9	2,3	4,8	7,8
Eiweiß % i. Tr.	49	12,5	35	10,7	48,3	12,1	31,5	11,6
Eiweißkoeffiz.	12,7	3,5	10,2	4,5	9,6	3,0	10,4	3,9
K.K.	37,5	33,2	40,7	57,9	34,9	30,8	47,4	51,6

	Stamm 16_b gutes Gärvermögen		Stamm *17* schwaches Gärvermögen		Stamm 23_c gutes Gärvermögen		Stamm *20* schwaches Gärvermögen	
	Blütengruppe Trifolium pratense				*Blütengruppe Linaria vulgaris*			
Harnstoffgabe	0,35%	0,075%	0,35%	0,075%	0,35%	0,075%	0,35%	0,075%
Lüftungsd.Std	40	53	40	53	45	61	46	64
Glucoseverbr. g/100 cm³	5,25	5,45	5,43	5,47	5,2	5,48	5,25	5,5
Trockenhefe g/100 cm³	1,259	1,634	1,677	2,217	1,279	1,379	1,302	1,861
Ö.K.	24	29,9	30,9	40,5	24,6	25	24,9	33,9
Fett % i. Tr.	3	6,8	11,5	17,3	4,9	10,7	14,9	19,3
Fettkoeffizient	0,7	2,0	3,5	7,0	1,2	2,7	3,7	6,5
Eiweiß % i. Tr.	40	8,7	37,8	9,4	44,6	10,7	36,0	8,8
Eiweißkoeffiz.	9,6	2,6	11,3	3,8	10,9	3,0	8,6	3,8
K.K.	31,8	34,7	44,1	53,7	34,0	31,2	36,8	45,8

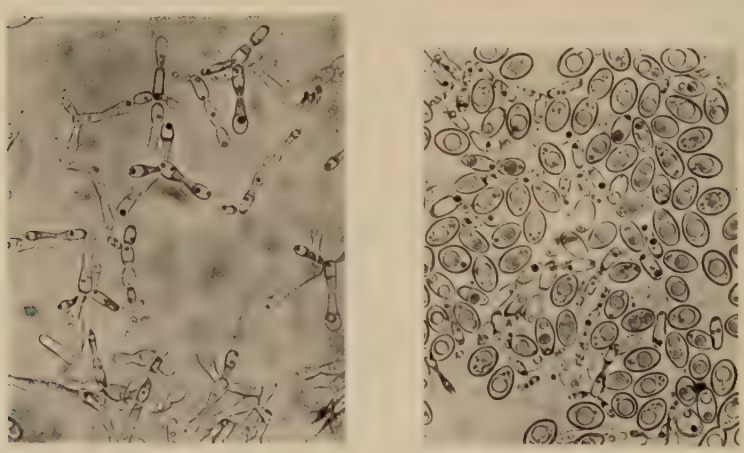
	Stamm 25_b gutes Gärvermögen		Stamm 26_b schwaches Gärvermögen	
	Blütengruppe Glechoma hederacea			
Harnstoffgabe	0,35%	0,075%	0,35%	0,075%
Lüftungsd.Std	60	72	45	61
Glucoseverbr. g/100 cm³	5,5	5,5	5,2	5,48
Trockenhefe g/100 cm³	1,433	1,050	1,894	2,218
Ö.K.	25,9	19,1	36,4	40,5
Fett % i. Tr.	4,7	7,4	20,4	25,3
Fettkoeffizient	1,2	1,4	7,3	10,1
Eiweiß % i. Tr.	32,9	15,9	26,3	8,6
Eiweißkoeffiz.	8,5	3,0	9,6	3,5
K.K.	33,7	23,3	54,1	58,1

erreicht wird. Eine weitere Steigerung der Harnstoffgabe bewirkt keine Erhöhung des Eiweißgehaltes mehr, sondern verursacht lediglich einen weiteren, starken Abfall des prozentualen Fettgehaltes. Da der Rückgang der Fettbildung durch entsprechend erhöhte Produktion von Eiweiß nicht wettgemacht werden kann, ist die Folge, daß mit steigender



a *b*

Abb. 11. Zellen aus den Lüftungskulturen. Vergr. 450fach. Versuchsreihe 1 (0,35% Harnstoff). *a* Stamm mit gutem, *b* Stamm mit schwachem Gärvermögen.



a *b*

Abb. 12. Zellen aus den Lüftungskulturen. Vergr. 450fach. Versuchsreihe 2 (0,075% Harnstoff). *a* Stamm mit gutem, *b* Stamm mit schwachem Gärvermögen.

Stickstoffzufuhr eine zunehmende Verschlechterung der Wachstumsökonomie eintritt. Auffallend ist bei Stamm 26_b (Tab. 6) und einigen anderen schwach gärenden Nektarhefen (12_b; *20*; 22_a) der recht hohe Fettgehalt auch bei Stickstoffüberschuß in der Nährlösung. Man hat den Eindruck, daß zumindest bei einem Teil der Stämme mit schwa-

Tabelle 6. *Stickstoffgabe und Ökonomischer Koeffizient bei einem schwach gärenden Stamm von C. Reukaufii: 26_b.*

Harnstoffgabe	0,5 g/100 cm³ = 0,235 g N_2, woraus maximal 1,47 g = 77% Eiweiß i. Tr. gebildet werden konnten	0,35 g/100 cm³ = 0,165 g N_2, woraus maximal 1,03 g = 54% i. Tr. Eiweiß gebildet werden konnten	0,075 g/100 cm³ = 0,035 g N_2, woraus maximal 0,22 g = 9,9% i. Tr. Eiweiß gebildet werden konnten
Ö.K.	33,6	36,4	40,5
Fett % i. Tr. . .	13,3	20,4	25,3
Fettkoeffizient .	4,5	7,3	10,1
Eiweiß % i. Tr. .	25,8	26,3	8,6
Eiweißkoeffizient	8,7	9,6	3,5
K.K.	46,5	54,1	58,1

chem Gärvermögen eine endogene Disposition zur Fettbildung besteht, die innerhalb gewisser Grenzen unabhängig von den Ernährungsbedingungen ist.

Genau umgekehrt liegen die Verhältnisse bei dem gut gärenden Stamm 5_a (Tab. 7). Bei reichlicher Stickstoffzufuhr bildet dieser

Tabelle 7. *Stickstoffgabe und Ökonomischer Koeffizient bei einem gut gärenden Stamm von C. Reukaufii: 5_a.*

Harnstoffgabe .	0,35%	0,075%	0,0375%
Ö.K.	26,0	27,6	23,6
Fett % i. Tr. . .	4,5	7,5	8,8
Fettkoeffizient .	1,2	2,1	2,1
Eiweiß % i. Tr. .	49,0	12,5	9,3
Eiweißkoeffizient	12,7	3,5	2,2
K.K.	37,5	33,2	28,3

Stamm viel Eiweiß. Bei Stickstoffmangel geht die Eiweißbildung zwangsläufig zurück, ohne durch eine entsprechend stärkere Fettbildung kompensiert zu werden, so daß der Ö.K. und besonders der K.K um so kleiner werden, je geringer die Stickstoffkonzentration in der Nährlösung ist. Diese Regel läßt sich nicht nur an Hand von Einzelbeispielen, sondern auch statistisch belegen: Tab. 8. Die folgenden Angaben sind Mittelwerte

Tabelle 8. *Durchschnittswerte für Ö.K., K.K., Fett- und Eiweißgehalt von 10 gut gärenden und 10 schwach gärenden Stämmen von C. Reukaufii.*

	gutes Gärvermögen		schwaches Gärvermögen	
Harnstoffgabe	0,35%	0,075%	0,35%	0,075%
Ö.K.	$24,9 \pm 0,7$	$25,0 \pm 1,3$	$29,7 \pm 1,4$	$34,5 \pm 1,6$[1]
K.K.	$34,4 \pm 1,1$	$30,8 \pm 1,6$	$42,2 \pm 1,8$	$48,1 \pm 2,3$
Fett % i. Tr.	$5,3 \pm 0,6$	$10,2 \pm 1,2$	$11,9 \pm 1,6$	$19,7 \pm 1,2$
Eiweiß % i. Tr.	$42,6 \pm 1,6$	$13,2 \pm 0,9$	$33,9 \pm 1,7$	$10,3 \pm 0,7$

[1] = mittlerer Fehler $\Delta_m x$.

aus Versuchsergebnissen von jeweils 10 schwach gärenden und 10 gut gärenden Stämmen.

Schließlich möchte ich noch besonders darauf hinweisen, daß auch die Schwesterstämme [z. B. (5_a; 5_b), vgl. Tab. 5] entsprechend ihrem stark verschiedenen Gärvermögen in Lüftungskultur in sehr deutlicher Weise die oben abgeleitete Regel befolgen.

Besprechung der Ergebnisse.

Nachdem sich der vermutete Zusammenhang zwischen Gärvermögen und Wachstumseigenschaften bestätigt hat, lassen sich 2 Varianten der Nektarhefe eindeutig voneinander abgrenzen. Der Gärtyp von *C. Reukaufii* besitzt gutes Gärvermögen für Glucose. Bei Wachstum in Lüftungskultur liefert er einen relativ niederen Ö.K. und K.K., wobei der Kalorische Koeffizient bei Stickstoffmangel kleiner ist als bei Stickstoffüberschuß. Der prozentuale Fettgehalt der Hefe ist gering und ist auch durch mangelhafte Stickstoffernährung nicht wesentlich zu steigern, dagegen ist der Eiweißgehalt bei guter N-Versorgung hoch. Die Hefe wächst in mehrzelligen Sproßverbänden oder in Kreuzform; große ovale Dauerzellen werden nicht beobachtet. Dementsprechend wird auch auf der Objektträger-Kultur reichlich Pseudomycel gebildet. In Würzeagar-Strichkultur entsteht nach 4 Wochen bei 17° C ein flaches, bräunliches, mehr oder weniger schleimig glänzendes Lager mit glattem Rand. In flüssiger Bierwürze erfolgt Wachstum meist nur in Form eines Bodensatzes; Hefering- und Hautbildung sind selten.

Die Stämme des Fettbildungstypus von *C. Reukaufii* vergären Glucose nur schwach, wachsen aber in Lüftungskultur sehr üppig und liefern im Durchschnitt einen bedeutend höheren Ö.K. und K.K. als die Stämme des Gärtyps. Die Hefe hat einen hohen prozentualen Fettgehalt und einen recht niederen Eiweißgehalt, auch bei reichlicher Stickstoffernährung. Wie zu erwarten, werden dabei sehr viele große, ovale, fettreiche Dauerzellen gebildet, die auch bei der Prüfung auf Fähigkeit zur Pseudomycelbildung auf Objektträgerkulturen entstehen. Pseudomycel fehlt meist ganz. Bei der Würzeagar-Strichkultur entsteht ein cremefarbiges, gewölbtes Hefelager mit glanzloser, glatter oder schwach gerauhter Oberfläche und gekerbtem Rand. In flüssiger Bierwürze von 10° Balling tritt nach 8—14 Tagen starke Hefering- und Hautbildung ein, was als Anzeichen für einen intensiven Atmungsstoffwechsel gewertet werden kann.

Alle beschriebenen Merkmale sind bei den untersuchten Stämmen innerhalb einer Beobachtungszeit von mehr als 2 Jahren konstant geblieben.

Die systematische Diagnose von Lodder u. Kreger-van Rij für die Art *Candida Reukaufii* (Grüss) Diddens et Lodder ist daher wohl in einigen wesentlichen Punkten der Ergänzung und Erweiterung bedürftig;

doch scheint eine Auftrennung der species in mehrere Arten oder Unterarten auf Grund der vorliegenden Ergebnisse weder gerechtfertigt noch ratsam in Anbetracht der taxonomischen Schwierigkeiten, die bei den anaskosporogenen Hefen bereits in besonders hohem Maße bestehen. Allein schon die Tatsache, daß das typischste und innerhalb des Hefereiches einzigartige morphologische Element der Nektarhefe, nämlich die Kreuzform im Blütennektar und in analogen, synthetischen Medien bei allen Stämmen beobachtet wird, gleichgültig ob sie dem Gärtyp oder dem Fettbildungstyp angehören, spricht gegen eine solche Teilung. Außerdem befriedigt auch vom rein biologischen Standpunkt aus eine strenge Trennung von Gär- und Fettbildungsvariante der Nektarhefe nicht recht. Nach den oben mitgeteilten Beobachtungen über die Ausbildung von verfetteten Dauerzellen im Nektar verwelkender Blüten[1] und über die Bedeutung der Fettzellen für die Überdauerungsfähigkeit der Hefen kann es kaum zweifelhaft sein, daß die Dauerzellenbildung für die Überdauerung und Verbreitung der Nektarhefen in der Natur von Bedeutung ist. Der Übergang der im Kreuzform-Sproßverband wachsenden Nektarhefe in die mit Fett beladenen Dauerzellen dürfte weitgehend identisch sein mit dem bei gewissen niederen Algen (v. Witsch, v. Denffer) eingehend untersuchten Wechsel zwischen einer Wachstumsphase und einer mit stark verlangsamtem Wachstum und reichlicher Anhäufung von Fett in den Zellen einhergehenden Speicherphase: „Konkordanz"- bzw. „Diskordanz-Zustand" nach Denk. Die Dauerzellen gelangen mit den abfallenden Blüten in den Boden und von dort aus im Sinne eines Hansenschen Hefekreislaufes wieder in neue Blüten, wobei Insekten, und zwar nach Hopf und nach eigenen Beobachtungen hauptsächlich Ameisen, als Überträger in Frage kommen. Wie sollte dann aber die natürliche Verbreitung des Gärtyps der Nektarhefe, der zu einer Bildung von Fettzellen und somit von Überdauerungsorganen nicht oder nur in beschränktem Umfange fähig ist, vor sich gehen?

Es liegt nahe, zur Erklärung dieser Verhältnisse an Sexualitätsvorgänge zu denken, durch deren Entdeckung bei einigen anderen Hefearten, z. B. bei *Zygosaccharomyces* (Winge u. Lautsen; Barker) bisher als völlig getrennt betrachtete Formen mit starken morphologischen und physiologischen Unterschieden als verschiedene Generationen ein und derselben Spezies erkannt wurden. Indessen liegen hierfür bei *Candida Reukaufii* noch keinerlei Beobachtungen vor, da eine Deutung der in Abb. 10 gezeigten Hautanhängsel an alten Dauerzellen als leere Asci in Analogie zu Windisch vorerst noch nicht möglich ist; eine Entscheidung dieser Frage muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

[1] Die Bildung fetthaltiger Dauerzellen in der Natur war von Rippel u. Mitarb. (1948) noch nicht beobachtet worden; diese Autoren sahen deshalb die Fettbildung in Lüftungskultur als einen erzwungenen Vorgang an.

Im Gegensatz zu Reukauf kann das Vorhandensein einer bestimmten „Rasse" der Nektarhefe in jeder Blütenart nicht festgestellt werden. Beide Varianten der Hefe, der Gärtyp und der Fettbildungstyp kommen in allen untersuchten Blütengruppen vor und können aus ein und derselben Blüte isoliert werden. Schließlich scheinen auch die ökologischen Bedingungen, unter denen die Existenz solcher „Rassen" nur möglich wäre, nicht gegeben zu sein. Die Nektarhefe wird durch honigsaugende Insekten, vor allem durch Hummeln und Bienen von einer Blüte in die andere gebracht. Diese Überträger müßten also stets nur die gleichen Pflanzen befliegen, damit die Nektarhefe immer wieder in ihre spezifische Blütenart gelangen würde. Nun ist zwar eine Blütenstetigkeit der Bienen bekannt, und Kugler hat auch für Hummeln nachgewiesen, daß die Honigsammlerinnen im allgemeinen nur eine Pflanzenart befliegen. Daneben konnte er aber auch beobachten, daß diese Regel oft durchbrochen wird, wenn gerade mehrere Blütenarten gleichzeitig gute Tracht liefern. Aber selbst bei absoluter Blütenstetigkeit müssen die Insekten doch spätestens nach dem Verblühen einer bestimmten Pflanzenart eine neue Futterquelle aufsuchen und damit die Hefe in eine andere Blütenart übertragen. Daß dabei eine gründliche Durchmischung „blütenspezifischer Nektarheferassen" stattfinden würde, kann nicht zweifelhaft sein.

Als wichtigsten Faktor für die Ausbildung der „Blütenrassen" der Nektarhefe bezeichnet Reukauf die unterschiedliche Beschaffenheit des Nektars bei verschiedenen Pflanzenarten. Nach Beutler (vgl. auch Wykes) schwankt dessen Zusammensetzung bei verschiedenen Blütenarten tatsächlich, aber es handelt sich dabei fast ausschließlich um Unterschiede im prozentualen Zuckergehalt und im Verhältnis Rohrzucker : Invertzucker. Andere wirksame Substanzen wie z. B. Aschenbestandteile und Stickstoffverbindungen sind im Nektar nicht in meßbaren Mengen vorhanden. Außerdem konnte Beutler zeigen, daß der Zuckergehalt des Nektars auch bei der gleichen Pflanzenart nicht konstant ist. Die Zuckerkonzentration ändert sich in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit und auch das Rohrzucker-Invertzuckerverhältnis schwankt im Tag-Nachtrhythmus von Assimilation und Dissimilation und bei Änderungen der Assimilationsintensität, verursacht durch wechselhafte Sonnenbestrahlung. Man kann daher wohl annehmen, daß die geringfügigen Unterschiede in der Gestaltung der „Kreuzformen" in verschiedenen Blütenarten, die Reukauf als ein wichtiges Argument für die Existenz seiner Blütenvarianten der Nektarhefe wertete, und die sich hauptsächlich in einer mehr oder weniger grazilen Ausbildung der Zellen äußern, weitgehend durch den gerade vorherrschenden Zuckergehalt und die damit verbundene osmotische Wirksamkeit des betreffenden Nektars zustande kommen. Daß an sich die Kreuzformen durch die Wirkung hoher Zuckerkonzentration zustande kommen, ist ja bekannt (Grüss, Hautmann).

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.

1. Aus den Blüten von 5 verschiedenen Pflanzenarten wurden insgesamt 46 Stämme der Nektarhefe *Candida Reukaufii* als Einzell-Kulturen isoliert. Auf die Isolierungen mehrerer Schwesterstämme aus ein und derselben Blüte wurde besonderer Wert gelegt.

2. Die untersuchten Hefen konnten in 2 Gruppen eingeteilt werden, für die jeweils eine Kombination bestimmter Eigenschaften charakteristisch ist:

I. Gärtyp der Nektarhefe:

a) gute Bildung von Pseudomycel,

b) auf Bierwürzeagar Wachstum als flaches, bräunliches, schleimig glänzendes Lager,

c) gute Vergärung von Glucose,

d) in Lüftungskultur ökonomischer Koeffizient und prozentualer Fettgehalt der Hefe niedrig; hoher prozentualer Eiweißgehalt. Wachstum in Form von Sproßverbänden.

II. Fettbildungstyp der Nektarhefe:

a) Fähigkeit zur Pseudomycelbildung kaum oder nicht vorhanden,

b) auf Würzeagar Wachstum als gewölbtes, cremefarbiges Lager, ohne Glanz,

c) schwache Vergärung von Glucose,

d) in Lüftungskultur ökonomischer Koeffizient und prozentualer Fettgehalt hoch; Eiweißgehalt niedriger als beim Gärtyp. Wachstum als Einzelzellen; reichliche Bildung großer, ovaler, fetthaltiger Dauerzellen, besonders bei mangelhafter Stickstoffernährung.

3. Diese zwei Varianten wurden bei allen untersuchten Pflanzenarten gefunden. Das bevorzugte Auftreten eines der beiden Typen in einer bestimmten Blütenart konnte nicht festgestellt werden. Fettbildungstyp und Gärtyp wurden mehrfach aus ein und derselben Blüte isoliert.

4. Einige Stämme des Fettbildungstyps, unter ihnen besonders Stamm 26_b bleiben vom Kohlenstoff/Stickstoffverhältnis in der Nährlösung weitgehend unbeeinflußt. Auch bei kleiner werdendem C/N-Verhältnis, das normalerweise die Proteinsynthese fördert und die Fettbildung unterdrückt, steigt der Eiweißgehalt der Hefe nicht über einen recht niederen Maximalwert an, während der Fettgehalt erst bei sehr kleinem C/N-Verhältnis wesentlich unter die bei großem C/N-Verhältnis beobachteten hohen Werte sinkt.

Literatur.

Barker, B. T. P.: Trans. Roy. Soc. (Lond.) **194**, 467 (1901). — Beutler, R.: Z. vergl. Physiol. **12**, 72 (1930). — Damm, H.: Chemiker-Z. **1943**, 47; Zbl. Bakter. I Orig. **155**, 337 (1950). — v. Denffer, D.: Arch. Mikrobiol. **14**, 159 (1950). — Denk, V.: Planta (Berl.) **32**, 630 (1942). — Diddens, H. A., u. L. Lodder: Die anaskosporogenen Hefen II. Amsterdam 1942. — Fink, H., G. Haeseler u. M. Schmidt: Z. für Spiritusindustrie **60**, 74 (1937). — Geffers, H.: Arch. Mikrobiol. **8**, 66 (1937). — Grüss, J.: Ber. dtsch. bot. Ges. **35**, 746 (1917—18). — Haehn, H.: Biochemie der Gärungen. Berlin 1952. — Hansen, E. Chr.: Zusammenfassung bei

A. Kloecker in Lafar: Handbuch der techn. Mykologie, Bd. IV, Jena 1907. — Hautmann, F.: Arch. Protistenkde **48**, 213 (1924). — Heide, S.: Arch. Mikrobiol. **10**, 135 (1939). — Hesse, A. in Nord-Weidenhagen: Handbuch der Enzymologie II. Leipzig 1940. — Hijner, J. A.: Experimentia (Basel) **2**, 8 (1946). — Hopf, M.: Arch. Mikrobiol. **14**, 661 (1950). — Janke, A.: Die Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Dresden und Leipzig 1946. — Kaufmann, W.: Arch. Mikrobiol. **17**, 319 (1952). — Koch, R., F. Thomas u. E. Bruchmann: Die Branntweinwirtschaft **3**, 65 (1949). — Kugler, H.: Erg. Biol. **19**, 143 (1943). — Lehmann, K. B., L. Maquenne u. N. Schoorl in Klein: Handbuch der Pflanzenanalyse, Band 2 I. — Lindner, P.: Chemiker Z. **1918**. — Lodder, L., u. N. J. W. Kreger-van Rij: The Yeasts. Amsterdam 1952. — Meyernof, O.: Biochem. Z. **162**, 43 (1925). — Myrbäck, K., u. H. v. Euler in Oppenheimer und Pincussen: Methodik der Fermente. Bd. 3 (1929). — v. Naegeli, C., u. O. Loew: Liebigs Ann. **193**, 322 (1878). — Nielsen, N.: Erg. Biol. **19**, 375 (1943). — Reukauf, E.: Die Kleinwelt **3**, 25 (1911—12); Aus der Natur **11**, 41 (1915). — Rippel-Baldes, A.: Arch. Mikrobiol. **11**, 271 (1940); Grundriß der Mikrobiologie. 2. Aufl. Berlin: J. Springer 1952. — Rippel-Baldes, A., u. K. Nabel: Arch. Mikrobiol. **10**, 369 (1939). — Rippel-Baldes, A., K. Pietschmann-Meyer u. W. Koehler: Arch. Mikrobiol. **14**, 113 (1948). — Stelling-Dekker, N. M.: Die sporogenen Hefen. Amsterdam 1931. — Schulze, K. L.: Arch. Mikrobiol. **15**, 315 (1950). — Talpai, E., zit. bei A. Rippel-Baldes: Nachr. Akad. Wiss. Göttingen 1947. — Windisch, S.: Arch. Mikrobiol. **9**, 551 (1938); **11**, 386 (1940). — Winge, Ö., u. O. Laustsen: C. r. Trav. Lab. Carlsberg, ser. physiol **6**, 99 (1937). — v. Witsch, H.: Arch. Mikrobiol. **14**, 99 (1950). — Wykes, G. B.: Biochem. Journ. **53**, 294 (1953).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 163—175 (1954).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie und dem Institut für Pflanzenpathologie der Universität Göttingen.)

Keimungsphysiologische Untersuchungen mit Sporen von Erysiphe graminis.

Von

K. H. Domsch.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Dezember 1953.)

Bei Infektionsversuchen mit *Erysiphe graminis* an Gerste (Domsch 1953) wurden folgende Beobachtungen gemacht: 1. Der mit einer Aufschwemmung von Conidien[1] erzielbare Infektionserfolg ist abhängig von der Dichte oder Konzentration der Suspension, d. h. von der Anzahl Sporen/ml Suspensionsmittel. 2. Sporen verschiedenen Alters führen bei konstanter Dichte der Suspension zu verschiedenen Befallsintensitäten. 3. Der Wirkungsgrad einer Sporensuspension sinkt nach Aufschwemmung der Sporen zunächst sehr stark ab und hält sich dann über längere Zeit auf nahezu gleicher Höhe.

Sofern in den Arbeiten früherer Autoren bei Infektionsversuchen der Konzentration der Sporensuspension Beachtung geschenkt worden ist, findet man für eine Auswahl verschiedener Parasiten: *Gibberella Zeae* (Andersen 1948), *G. Saubinetii* (Dickson 1923), *Tilletia triticina* (Heald 1921), *Synchytrium endobioticum* (Glynne 1925) die Angabe, daß mit steigender Sporenzahl in der Aufschwemmung der Infektionserfolg linear oder in einer logarithmischen Kurve ansteigt. Nur von Meyer (1950) wurde für *Erysiphe graminis* eine Beobachtung mitgeteilt, die mit unseren Befunden weitgehend übereinstimmt. Es ist weiterhin aus der Literatur bekannt (Metzger 1942), daß Mehltausporen nach 48 Std unter natürlichen Verhältnissen keine Keimfähigkeit mehr besitzen; während nach Angaben von Sempio und Castori (1950) die Conidien vom 2. bis zum 4. Tage nach der Bildung die höchste Vitalität haben sollen. Diese Periode ist durch hohe Keimprozente und hohe Keimschlauchlängen charakterisiert.

Es war das Ziel dieser Arbeit, die Ursachen für die oben mitgeteilten Beobachtungen an Mehltausporen zu ermitteln.

I. Material und Methode.

Als Wirtspflanze wurde eine gegen Mehltau hochanfällige Sommergerste verwendet. Da die numerische Erfassung des Infektionserfolges nur mit großem Arbeits- und Materialaufwand möglich ist, sollte der unterschiedliche Wirkungsgrad der Sporensuspensionen auf einem kürzeren Wege als über den Infektionsversuch ermittelt werden. Die Mehltausporen

[1] Im folgenden „Sporensuspension".

selbst erwiesen sich als gut geeignete Testobjekte, da in verschieden zusammengesetzten Suspensionen erhebliche Unterschiede in den Keimprozenten auftraten. Es war zu erwarten, daß keimungsphysiologische Versuche einen Beitrag zur Klärung der aufgeworfenen Fragen liefern würden.

Als Maß für die Beurteilung der Versuche dienten die Keimprozente. Die Auswertung wurde insofern vereinfacht, als die Keimschlauch l ä n g e nicht berücksichtigt wurde (vgl. Tompkins 1932). Jeder Ansatz eines Keimschlauches galt als „gekeimt", wobei in den meisten Fällen geringe Keimprozente mit kurzen Keimschlauchlängen — und umgekehrt — einhergingen. Die Keimprozente wurden nach Auszählen von 200—1000 Sporen, je nach Größe der zu sichernden Differenz, errechnet. Die Keimdauer betrug, wenn nicht anders angegeben, 24 Std; die Temperatur 20—25° C.

Soweit es notwendig war, Sporen gleicher Anzahl in verschiedenen Suspensionsmitteln aufzunehmen, wurde von einer größeren Menge Sporensuspension die erforderliche Anzahl gleicher Teile hergestellt. Die Proben wurden dann scharf zentrifugiert, nachdem ein Vorversuch erwiesen hatte, daß das Zentrifugieren in weiten Grenzen die Sporenkeimung nicht beeinflußt. Das überstehende Wasser (1. Suspensionsmittel) wurde danach abgegossen, und die Sporen wurden mit der gleichen Menge der gewünschten Flüssigkeit (2. Suspensionsmittel) erneut aufgenommen.

Zur Erhöhung der Genauigkeit empfiehlt es sich, graduierte Zentrifugengläser zu verwenden, denn trotz sorgfältiger Verteilung der Suspension ist beim späteren Auszählen der Sporendichte in den einzelnen Proben noch mit einem Fehler von etwa 10% zu rechnen.

Da Sporen, die von befallenen Gerstenblättern t r o c k e n in ein Reagensglas gestäubt wurden, im Gegensatz zu abgespülten Sporen nur schwer benetzbar waren, wurde als erstes Suspensionsmittel — wenn notwendig — Dodecylsulfat (10^{-4} g/l) verwendet. Es ist zu erwähnen, daß dieses Netzmittel als Keimmedium (2. Suspensionsmittel) nicht ohne Wirkung auf die Sporenkeimung ist (Tab. 1).

Tabelle 1. *Einfluß verschiedener Suspensionsmittel auf die Keimung der Conidien von Erysiphe graminis.*

Suspensionsmittel	Keimprozente
Aqua tridestillata	31
„ + Na-laurylsulfonat 10^{-3} g/l	9
„ + Na-laurylsulfonat 10^{-4} g/l	9
„ + Dodecylsulfat 10^{-3} g/l	42
„ + Dodecylsulfat 10^{-4} g/l	49
„ + Dodecylsulfat 10^{-4} g/l + NaCl 0,16 mol	12
„ + Dodecylsulfat 10^{-4} g/l + Glucose 0,16 mol	20
„ + NaCl 0,16 mol	13
„ + Glucose 0,16 mol	25

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß destilliertes Waser offenbar uneingeschränkt als Keimmedium geeignet ist[1], und daß physiologische Kochsalzlösung sowie eine entsprechende Glucoselösung die Keimprozente herabsetzten. Von den zwei angewandten Netzmitteln ist Dodecylsulfat das geeignetere. In einer Konzentration von 10^{-4} g/l (bei Mehltausporen Grenze der Netzwirkung) ist sogar eine deutliche

[1] Der theoretische Wert von 100% gekeimten Sporen wurde in den Versuchen nicht erreicht.

Förderung der Sporenkeimung gegenüber der Wasserkontrolle zu beobachten. Weitere methodische Angaben sind aus der Beschreibung der Versuche zu ersehen.

Die Ergebnisse wurden, sofern das notwendig erschien, statistisch ausgewertet. Die Signifikanz für die Trennbarkeit zweier Meßwerte wird durch P-Werte wiedergegeben (Pätau 1943).

II. Die Versuche.

1. Einfluß der Sporenkonzentration auf die Keimung.

Es wurden bei diesen Versuchen Sporensuspensionen hergestellt ($1{,}5 \cdot 10^6$ Sporen/ml) und jeweils mit dem gleichen Suspensionsmittel in 5 Stufen auf die Hälfte der vorhergehenden verdünnt.

Die eindeutige Abhängigkeit der Keimprozente von der Sporenzahl im Keimmedium ist aus der Darstellung eines dieser Versuche in Abb. 1

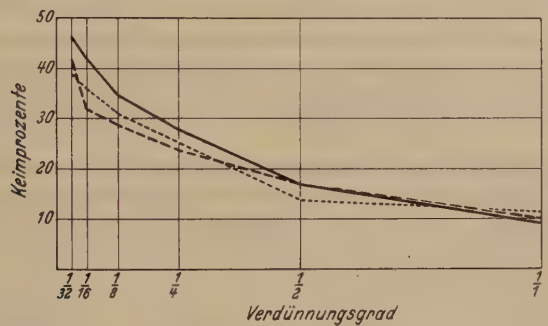


Abb. 1. Abhängigkeit der Sporenkeimung von der Konzentration der Suspension. Die drei Kurven geben die Verhältnisse bei drei aufeinanderfolgenden Zählungen am gleichen Material wieder.

ersichtlich. Mit zunehmender Sporendichte (1/1 entspricht der höchsten Konzentration) sinkt der Anteil gekeimter Sporen. Zugleich wird hier die Verläßlichkeit der Methode herausgestellt: Drei Auswertungen des gleichen Materials ergaben befriedigend übereinstimmende Werte. Zur Information über die statistische Trennbarkeit der Werte sei ein weiterer gleichartiger Versuch angeführt (Tab. 2).

Da die Sporen in völlig nährstoffreiem Wasser aufgeschwemmt wurden, kommen als Ursachen für die Zurückdrängung der Keimung in starken

Tabelle 2. *Keimprozente von Sporensuspensionen verschiedener Dichte. Der P-Wert ist jeweils auf die zwei aufeinanderfolgenden Werte der Keimprozente zu beziehen.*

Verdünnungsstufe	Keimprozente	Mittlere Abweichung	P-Werte
1/1	3,5	0,7	0,01
1/2	7	1,2	<0,0027
1/4	27	2,1	<0,0027
1/8	46	2,4	0,0027
1/16	61	2,6	0,13
1/32	67	2,9	

Suspensionen folgende Möglichkeiten in Frage: 1. Sauerstoffmangel, 2. starke Kohlensäure-Anreicherung im Keimmedium, 3. Anreicherung einer vom Pilz (Spore oder Keimschlauch) ausgeschiedenen Substanz außer CO_2, 4. Beeinflussung des Keimmediums durch Fremdstoffe.

Grundsätzlich wäre damit zu rechnen, daß Bakterien oder andere Verunreinigungen das Keimmedium beeinflussen, da der Pilz nicht auf steril angezogenen Pflanzen kultiviert wurde. Die Entwicklung von Bakterien ist aber während der Keimungsdauer so gering, daß man diese Möglichkeit vernachlässigen darf.

Wichtiger ist die Frage, ob Sauerstoffmangel im Laufe der Keimung eintritt, der durch Diffusion nicht in der gleichen Geschwindigkeit ausgeglichen werden kann. Es wurde zunächst versucht, die Bedingungen im Keimmedium durch Belüftung mit reinem Sauerstoff zu verbessern.

Um während der Durchlüftung eine Einengung der Flüssigkeit zu vermeiden, wurde vor das Versuchsröhrchen eine Flasche mit destilliertem Wasser geschaltet. Belüftungsdauer 17 Std, Strömungsgeschwindigkeit des Gases durch 30 ml Sporensuspension: 15 ml/min, Dichte der Suspension: $8 \cdot 10^5$ Sporen/ml (Tab. 3).

Tabelle 3. *Einfluß einer Durchlüftung der Sporensuspension auf die Keimung.*

Durchlüftet mit	Keimprozente	Mittlere Abweichung	Sicherung gegen Kontrolle (P-Werte)
O_2	33,5	1,2	$< 0{,}0027$
N_2	7,5	1,1	$< 0{,}0027$
Kontrolle	20,0	1,5	

Die Ergebnisse zeigen, daß Sauerstoff in einer starken Suspension die Keimungsbedingungen verbessert. Durch Einleiten von reinem Stickstoff wird das Keimmedium bis auf die Hälfte des normalen Gehaltes an Sauerstoff verarmt[1], die Keimprozente sinken erwartungsgemäß stark ab.

Tabelle 4. *Einfluß von Durchlüftung und Sauerstoffabsorption auf die Sporenkeimung in flüssigen Medien.*

Art der Behandlung	Keimprozente	Mittlere Abweichung	Sicherung gegen Kontrolle (P-Werte)
Durchlüftet	65	2,5	0,0027
O_2-frei	15	1,4	$< 0{,}0027$
Kontrolle	29	3,0	

In einem weiteren Versuch wurden Röhrchen teils mit Zimmerluft durchlüftet und andererseits durch einen Wright-Burry-Verschluß weitgehend sauerstoffrei gehalten. Es ergaben sich die — für einen Versuch — in Tab. 4 zusammengestellten Keimprozente.

[1] Im Lösungsgleichgewicht mit der Luft enthält Wasser bei 20° C 6,4 ml O_2/l, bei einem Sauerstoffdruck von 760 mm Hg 31 ml O_2/l.

Belüftet man nach Abschluß des Versuches die sauerstoffreie Kultur, so sind nach 24 Std über 50% gekeimte Sporen auszählbar! Die Sporen werden also nicht irreversibel geschädigt.

Mit diesen Ergebnissen ist ein Faktor, der die Sporenkeimung in starken Suspensionen beeinflussen kann, deutlich herausgestellt. Man wird aber daran denken müssen, daß sowohl Durchlüftung als auch Sauerstoffentzug in der im Versuch angewandten Weise extreme Verschiebungen der Keimungsbedingungen darstellen, wie sie sich im Laufe der Keimung nicht unbedingt einstellen werden. Es wurde deshalb unternommen, die absolute Größe der Sauerstoffaufnahme einer Sporensuspension in der WARBURG-Apparatur zum Vergleich zu messen. Der Sauerstoffverbrauch einer frisch angesetzten Sporensuspension lag im Bereich des Meßfehlers! Der Sauerstoff gerät wahrscheinlich unter normalen Bedingungen garnicht ins Minimum. Die Keimungshemmung in starken Suspensionen muß dann auf andere Faktoren zurückgeführt werden. Diese Annahme gewinnt an Bedeutung, wenn man zur Beurteilung die Ergebnisse zweier weiterer Versuche heranzieht:

1. Stäubt man Sporen trocken auf eine Glasplatte auf, die man dann in eine sauerstoffreie, feuchte Kammer bringt, so wird die toxische Wirkung eines Stoffwechselproduktes, das sich in den bisher dargestellten Versuchen möglicherweise im Wasser anreichern könnte und in der Lösung seine Wirkung entfaltet, ausgeschaltet. Eine Keimungshemmung wäre in diesem Falle allein auf die Hemmung der Atmung zurückzuführen. Die Ergebnisse aus 5 Versuchen gibt Tab. 5.

Tabelle 5. *Einfluß der Sauerstoffabsorption auf die Sporenkeimung in feuchter Kammer.*

	Keimprozente	Mittlere Abweichung	Sicherung gegen Kontrolle (P-Werte)
O_2-frei	46	2,6	0,4
Kontrolle	43	2,8	
O_2-frei	67	3,2	0,4
Kontrolle	63	3,9	
O_2-frei	73	2,7	0,008
Kontrolle	62	2,8	
O_2-frei	52	3,7	0,03
Kontrolle	41	3,1	
O_2-frei	47	2,6	0,03
Kontrolle	38	2,8	

In diesen Versuchen ergaben sauerstoffreie Kulturen und Kontrollen keine signifikant trennbaren Werte. Es ist zwar auch hier festzustellen, daß die Keimung in sauerstoffreier Atmosphäre schlechter als unter normalen Bedingungen verläuft, aber ein Vergleich des Quotienten: „Keimprozente der Kontrolle/Keimprozente sauerstoffrei“ bei Keimung in

feuchter Kammer und in wäßriger Suspension gibt im ersten Falle im Durchschnitt (Mittelwert aus mehreren Versuchen) einen Wert von 1,1 und im zweiten Falle 1,6. Im Wasser ist also die Hemmung unter Sauerstoffmangel größer als in feuchter Luft.

2. Durch Na-azid läßt sich die Sporenkeimung hemmen. In einem Vorversuch wurde folgende Konzentrationsabhängigkeit ermittelt (Tab. 6):

Tabelle 6. *Einfluß von Na-azid auf die Sporenkeimung.*

Bei 0,01 mM Azid	30%	gekeimte	Sporen
„ 0,1 „ „	13%	„	„
„ 1,0 „ „	7%	„	„
„ Kontrolle	46%	„	„

Wäre in einer starken Sporensuspension gegenüber einer verdünnten die Keimungshemmung allein auf die Herabsetzung der Sauerstoffversorgung zurückzuführen, so müßten nach Na-azid-Zusatz in der Halbwertkonzentration die Differenzen in den Keimprozenten aufgehoben werden, denn der im Minimum befindliche Sauerstoffaktor wäre durch Blockierung der Atmungsfermente in allen Sporen ausgeschaltet. In dem entsprechenden Versuch wurden 3 Sporenkonzentrationen verwendet (stark, mittel, schwach); aufgeschwemmt wurde einmal in Wasser, zum anderen in 0,01 mM Na-azid. Aus Tab. 7 sind die Werte

Tabelle 7. *Wirkung von Na-azid in verschieden konzentrierten Sporensuspensionen.*

Vers. Nr.	Art der Sporensuspension	Keimprozente	Mittlere Abweichung	Zu sichernde Differenz + P-Werte
1	Stark/Wasser	25	2,1	(2—1) 0,0027
2	Mittel/Wasser	45	2,9	(3—2) 0,02
3	Schwach/Wasser . .	55	3,1	(5—4) 0,0027
4	Stark/Azid	13	2,1	(6—5) 0,4
5	Mittel/Azid	38	2,3	(1—4) $<$0,0027
				(2—5) 0,06
6	Schwach/Azid . . .	41	3,1	(3—6) $<$0,0027

zu ersehen. Da von der starken zur schwachen Suspension der Anstieg der Keimprozente erhalten bleibt und die Differenzen nicht durch Azid-Blockierung nivelliert werden, darf wie oben gefolgert werden, daß ein zusätzlich hemmendes Prinzip in der Sporensuspension vorhanden ist.

Wenn bisher gezeigt wurde, daß nicht allein Sauerstoffmangel die Sporenkeimung begrenzt, so ist zu beachten, daß keimende Pilzsporen zum Teil sehr CO_2-empfindlich sind[1]. Wenn sich CO_2 im Keimmedium anreichern sollte, so müßte es zu einer p_H-Verschiebung in der Suspension kommen; es ändert sich jedoch der p_H-Wert von starken sowie schwachen Aufschwemmungen im Verlauf der Keimung nicht meß-

[1] Hemmung von Rostpilzsporen ab 1% (Stock, 1931). Vgl. auch Angaben von Brodie u. Jones (1946), Brodie u. Neufeld (1942) sowie Corner (1935) über *Erysiphe*.

bar. (Die Werte liegen während einer Dauer von 24 Std um 0,1—0,2 p_H-Werte unter der Wasserkontrolle.) Aber auch der p_H-Wert von CO_2-gesättigtem destilliertem Wasser bleibt über 24 Std in einer unbewegten Flüssigkeit konstant, die Einstellung des Lösungsgleichgewichtes erfolgt also nicht während der Dauer eines Keimversuches. Offen bliebe demnach die Möglichkeit, daß bereits sehr geringe CO_2-Mengen hemmend wirken. Die folgende Zusammenstellung zeigt allerdings, daß in einer gesättigten CO_2-Lösung von der Verdünnung 1/100 an — das entspricht einem CO_2-Gehalt des Wassers von etwa 1,7 mg/l gegenüber dem normalen Regenwasser von 0,6 mg CO_2/l — und einem p_H von 5,6 die Keimung möglich ist (Tab. 8).

Tabelle 8. *Wirkung eines abgestuft kohlensauren Mediums auf die Sporenkeimung.*

Verdünnungsstufe	p_H des Keimmediums	Keimprozente
1/1	4,00	7
1/10	4,75	27
1/100	5,60	36
1/1000	5,95	36
Kontrolle	6,25	—

Dieser CO_2-Gehalt wird aber in der Sporensuspension während der Keimung nicht entfernt erreicht, wie die oben angeführten p_H-Messungen zeigen. Auch in der WARBURG-Apparatur ist keine wesentliche CO_2-Bildung in der Sporensuspension meßbar.

Die Frage nach der O_2- und CO_2-Abhängigkeit der Sporenkeimung wurde hier so eingehend dargestellt, weil die Ergebnisse zu der Konsequenz führen, daß *ein von der Spore ausgeschiedener Stoff außer CO_2 in der Sporensuspension die Keimung beeinflußt.*

Wenn wir annehmen wollen, daß sich eine noch unbekannte Substanz in der Sporensuspension anreichert, so ist zu erwarten, daß die hemmende

Tabelle 9. *Einfluß des Zentrifugates von Keimmedien auf die Keimung frisch geernteter Sporen in mittlerer Suspensionsdichte.*

	Keimprozente	Mittlere Abweichung	Sicherung gegen Kontrolle (P-Werte)
Kontrolle	60	3,3	0,0027
Zentrifugat	45	3,6	
Kontrolle	59	4,4	< 0,0027
Zentrifugat	38	2,5	
Kontrolle	45	2,6	< 0,0027
Zentrifugat	28	2,9	
Kontrolle	38	2,1	< 0,0027
Zentrifugat	11	1,4	
Kontrolle	52	3,1	< 0,0027
Zentrifugat	28	2,6	

Wirkung des Stoffes auch im Zentrifugat einer 24 Std alten Sporensuspension wiederzufinden ist. Einige Ergebnisse solcher Versuche sind in Tab. 9 zusammengestellt, sie stimmen mit der Erwartung überein.

Ein weiterer Beleg für die von dem Zentrifugat ausgehende Hemmwirkung sind die Keimprozente einer Zentrifugat-Verdünnungsreihe (Abb.2).

Um für weitere Versuche nicht allein auf den Keimungstest angewiesen zu sein, und da es als erwiesen gelten konnte, daß geringe Mengen einer pilzeigenen Substanz in das Keimmedium abgegeben werden, wurde nach einer chemischen Nachweisreaktion für diesen Stoff gesucht. Es zeigte sich, daß unter anderem Phosphorwolframsäure(PW)-Reagenz

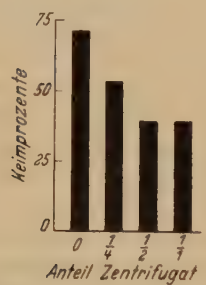


Abb. 2. Wirkung eines in verschiedenen Stufen verdünnten Zentrifugates einer 24 Std alten Sporensuspension auf die Keimung frisch geernteter Sporen.

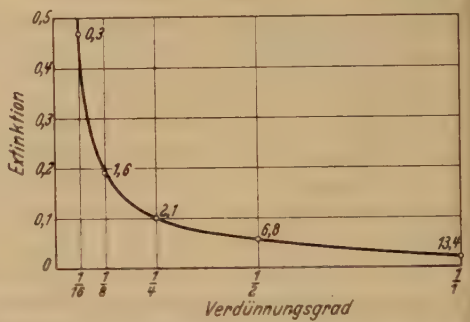


Abb. 3. Abhängigkeit der Extinktion vom Verdünnungsgrad einer Sporensuspension. Die in die Kurve eingetragenen Zahlen geben die Konzentration der Sporen in 10^5 Sporen/ml an.

(nach Folin) in einem Zentrifugat, das die Keimung der Mehltausporen beträchtlich zu hemmen vermochte, stark reduziert wird[1].

In Ermangelung einer Bezugsgröße sind im folgenden die im Kompensationsphotometer gemessenen Extinktionen (blaue Farbe) bei gleichem Filter (620 mμ) und gleicher Schichtdicke angegeben. Da sowohl trocken abgenommene Sporen als auch von Blättern abgeschwemmte nach Suspendierung ein reduzierendes Zentrifugat lieferten, nicht aber Wasser, in dem Gerstenblätter gründlich aufgeschüttelt worden waren, durfte mit Sicherheit angenommen werden, daß die reduzierende Substanz nur vom Pilz ausgeschieden wird.

Zum Abschluß der Versuche über den Einfluß der Sporenkonzentration sei ein Versuch (Abb. 3) wiedergegeben, bei dem in dem Zentrifugat verschieden starker Suspensionen die PW-Reduktion bestimmt wurde. Die Kurve zeigt, daß mit steigender Sporendichte die Extinktion im gleichen Verhältnis ansteigt.

Ergebnis: *Die Sporenkeimung kann durch Sauerstoffmangel und starken Kohlensäuregehalt des Keimmediums begrenzt werden. In starken Suspensionen kommen diese Faktoren nicht für die Keimhemmung in Betracht.*

[1] Inwieweit die reduzierende Substanz mit der toxisch wirksamen identisch ist, konnte noch nicht völlig geklärt werden. Entsprechende Versuche sind im Gange.

In das Keimmedium von Mehltausporen *geht ein Stoff über, der sich* je nach der Menge der Sporen in seinen relativen Konzentrationen *biologisch und chemisch nachweisen läßt.*

2. Einfluß des Sporenalters auf die Keimung.

Aus den oben genannten Infektionsversuchen liegt weiterhin die Beobachtung vor, daß die Verwendung von Suspensionen junger Sporen (1 Tag nach der Bildung) zu geringen Befallsintensitäten führt, daß das Optimum bei einem Sporenalter von 4 Tagen liegt und daß über dieses Alter hinaus die erreichbare Befallsintensität wieder abnimmt. In gewissen Grenzen konnte im Keimungstest eine ähnliche Abhängigkeit gefunden werden. Mit zunehmendem Alter ließen sich in zwei Versuchen folgende Keimprozente und in einem dritten den Keimprozenten entsprechende Extinktionswerte auszählen:

34 — 39 — 21 — 21 — 18% gekeimte Sporen
37 — 63 — 38 — 32 — 27% „ „
0,134 — 0,266 — 0,174 — 0,146 Extinktionswerte („Pw-Reduktion").

Allen Versuchen ist ein kurzer Anstieg zu einem Höchstwert und Abnahme mit steigendem Alter gemeinsam. Diese Versuche ließen sich jedoch statistisch nicht sichern!

Die Schwierigkeit liegt in der Gewinnung definiert verschieden alter Sporen und in der Herstellung gleich konzentrierter Sporensuspensionen in einer möglichst kurzen Zeit. In diesen Versuchen wurde die Suspension mit einer Einwaage trocken abgestäubter Sporen hergestellt.

Da bei der Sporenreife nicht nur die parasitischen Eigenschaften des Mehltaus stärker hervortreten, sondern noch eine ganze Reihe anderer Prozesse (Membranbildung, Versorgung mit Reservestoffen, Loslösung aus der Conidienkette) einhergehen, die sämtlich erst im Endstadium ihres Ablaufs die Sporen voll keimfähig machen (vgl. Wilkins 1938), ist in unserem speziellen Falle kein eindeutiges Ergebnis zu erwarten gewesen.

3. Sporenkeimung in Suspensionen verschiedenen Alters.

Wenn in einer Sporensuspension der „Wirkungsgrad" schon bald nach Bereiten der Suspension absinkt, so muß man — unter Berücksichtigung der oben gewonnenen Einsichten — mit der Möglichkeit rechnen, daß 1. die Keimung der Sporen sehr bald einsetzt und gekeimte Sporen für eine Infektion untauglich werden[1], oder daß 2. eine toxische Substanz sich im Laufe der Zeit im Medium anreichert — und zugleich aus den Sporen entfernt wird —, die nach Überschreiten einer Schwelle auf die Sporen selbst toxisch wirkt.

An der ersten Annahme kann nicht festgehalten werden, wenn man die Zunahme der Keimprozente im Verlauf von 24 Std registriert. Das wurde

[1] Eine Erklärung, die Noyer (1941) beim Mehltau für wahrscheinlich hält.

für eine starke und eine schwache Suspension sowie bei der Keimung in feuchter Kammer durchgeführt. Abb. 4 zeigt, daß 2 Std nach Ansetzen der Suspension unter günstigen Bedingungen erst 10% der Sporen gekeimt sind, daß also das Infektionsvermögen nicht deshalb absinkt, weil alle infektionstüchtigen Sporen ausgekeimt sind. Die außerordentliche Verzögerung der Keimung in starker gegenüber schwacher Suspension und feuchter Kammer spricht auch hier für einen in das Keimmedium abgegebenen Hemmstoff.

In den folgenden Experimenten wurde versucht, diesen Stoff zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Keimung „abzufangen". Der mit der PW-Reduktion geführte Nachweis zeigte das überraschende, in Tab. 10 niedergelegte Ergebnis. Nach 10 Std Keimungsdauer ließ sich keine Steigerung der Reduktion finden, sondern offenbar ist bereits in den ersten 45 min die fragliche Substanz in das Keimmedium diffundiert. In einem anschließenden Versuch dauerte die kürzeste Zeit vom Aufschwemmen der Sporen bis zur Analyse 13 min. Von diesem Zeitpunkt an wurden alle 15 min Proben entnommen; in den ersten 45 min wurden also 2 Analysen durchgeführt. An dem Ergebnis änderte sich jedoch nichts: die an der ersten Probe gemessenen Werte blieben unverändert auch über 3 Std bestehen.

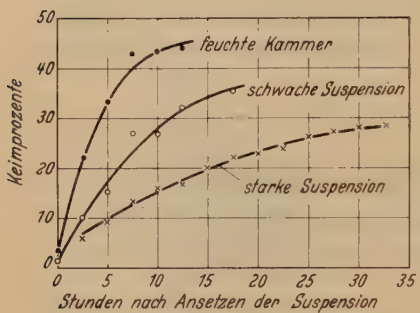


Abb. 4. Zunahme der Keimprozente im Verlauf der Keimung unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Tabelle 10. *Extinktion von Teilen des Keimmediums im Laufe der Keimung.*

Zeit (Minuten) nach Ansetzen der Sporensuspension . .	45	105	165	285	390	585
Extinktion	0,213	0,208	0,213	0,215	0,213	0,202

Unter diesen Umständen mußte es erfolgreich sein, Sporen zu extrahieren und gegen eine nicht extrahierte Kontrolle zu testen.

Von einer Suspension wurde zu diesem Zweck sofort nach dem Aufschütteln ein Teil zentrifugiert, dekantiert und in frischem Wasser erneut aufgenommen.

Tabelle 11. *Wirkung einer wäßrigen Extraktion auf die Keimfähigkeit der Sporen in starker Suspension* ($7 \cdot 10^5$ Sporen/ml).

Behandlung	Keimprozente	Mittlere Abweichung	Sicherung gegen Kontrolle (P-Werte)
Extrahiert	23,0	1,1	$< 0{,}0027$
Kontrolle	7,4	0,8	

Die Ergebnisse (Tab. 11) bestätigen die Vermutung, daß die extrahierten Sporen weitaus höhere Keimprozente aufweisen als die Kontrolle. In zwei weiteren Versuchen ergab sich ein ganz ähnliches Bild: Wurden zu verschiedenen Zeiten im Laufe des Versuchs aus der Suspension Sporen entnommen, zentrifugiert und in Wasser wieder aufgenommen, so ergaben sich nahezu gleichförmige Keimprozente.

1. Versuch: 51 — 41 — 47 — 47% gekeimte Sporen
2. Versuch: 32 — 32 — 37 — 33 — 33% „ „

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß man die Sporen nur einmal mit Erfolg extrahieren kann. Wurden nämlich Sporen sofort nach der Aufschwemmung zentrifugiert, erneut in frischem Wasser aufgenommen und die Flüssigkeiten nach 40 und 80 min in gleicher Weise geprüft, so konnten die Extinktionen 0,787 — 0,062 — 0,040 gemessen werden. Ein Gehalt an reduzierender Substanz bleibt somit auf den ersten Extrakt beschränkt. Auch hierin wird deutlich, daß die Substanz in reifen Sporen fertig vorliegt und im Verlauf der Keimung nicht in nennenswerten Mengen nachgebildet wird.

Ergebnis: *Im Verlauf der Keimung kann eine Zunahme des hemmenden Prinzips in der Sporensuspension nicht festgestellt werden*, die reduzierende Substanz läßt sich sofort nach dem Aufschwemmen fast vollständig extrahieren.

III. Besprechung der Ergebnisse.

Beim Mehltau kommt es nach den von Sempio mitgeteilten Atmungsmessungen schon sehr bald nach dem Beimpfen der Wirtspflanze zu einer Atmungssteigerung, die kennzeichnend für den ganzen Krankheitsverlauf bleibt (Allen u. Goddard 1938, Sempio 1950). Wenn die Atmungssteigerung auftritt, bevor vom Pilz Appressorien gebildet worden sind — und das ist offensichtlich der Fall —, dann muß die Ursache für die Atmungssteigerung in einem vom Pilz ausgeschiedenen, leicht diffundierbaren Stoff liegen, der vor dem mechanischen Eindringen der Parasiten physiologische Reaktionen in der Wirtpflanze auslöst.

In unseren Versuchen konnte der Nachweis einer leicht löslichen Substanz erbracht werden, die von Mehltausporen in das Keimmedium abgegeben wird. Toxische Substanzen, die von keimenden Sporen ausgeschieden werden, sind schon von Doran (1922) vermutet worden, als er bei der Keimung von Sporengemischen spezifische Hemmungen beobachten konnte. Im vorliegenden Falle erscheint es von Bedeutung, daß an einem obligat biotrophen Parasiten ein Glied des sehr komplexen stofflichen Wechselspiels eusymbiontischer Partner freigelegt worden ist. Die Reversibilität der an den Sporen beobachteten Hemmung dürfte für die Ausbreitung des Parasiten auf der Pflanze von großer Bedeutung sein.

Andererseits ergeben sich für die Klärung der an einigen Objekten festgestellten numerischen Infektionsschwelle (Gäumann 1951) neue Gesichtspunkte. Für die von uns früher mitgeteilten Beobachtungen über den Wirkungsgrad verschieden zusammengesetzter Suspensionen eröffnen sich mit der Annahme eines Toxins Möglichkeiten zur Deutung:

1. Ein Infektionserfolg tritt erst nach Anreicherung einer bestimmten Mindestmenge Toxin in der Suspensionsflüssigkeit ein. Nach Überschreiten eines Schwellenwertes sinkt der Infektionserfolg, da die Sporen selbst geschädigt werden. Trocken aufgestäubte Sporen sind wesentlich infektionstüchtiger, da sie nicht „extrahiert" worden sind. Wir müssen dabei voraussetzen, daß die Summe aller innerhalb der Einzelsporen gespeicherten Toxinmengen eine andere Wirkung entfaltet als die von außen auf sie einwirkende gleiche Menge.

2. In einer frisch aufgeschwemmten optimalen Sporensuspension sinkt der Wirkungsgrad nicht, weil die Sporen auskeimen, sondern weil offenbar schon sehr schnell nach dem Aufschwemmen der Sporen infektionswichtige Substanz in das Suspensionsmittel abgegeben wird.

Über den Wirkungsmechanismus des Mehltau-Toxins, der wahrscheinlich wesentlich von den Mechanismen bisher bekannter Toxine phytopathogener Pilze abweicht, wird man erst nach Identifizierung der Substanz Aufschlüsse gewinnen können.

Zusammenfassung.

1. Die bei Verwendung von Sporensuspensionen hoher Konzentration auftretende Depression des Infektionserfolges wird der verminderten Keimfähigkeit der Mehltausporen in dem entsprechenden Keimmilieu gegenübergestellt. Es ergibt sich die Korrelation: je größer die Sporendichte in der Suspension, desto geringer der Infektionserfolg, desto geringer die Keimprozente.

2. Die Analyse der die Keimung beeinflussenden Faktoren zeigte eine Abhängigkeit von der Sauerstoffversorgung unter extremen Bedingungen und in den Grenzen der Versuchsbedingungen keinen Einfluß des Kohlensäuregehaltes im Keimmedium.

3. Es wird nachgewiesen, daß von den Sporen ein Stoff in das Keimmedium abgegeben wird, der die Keimung reversibel zu hemmen vermag. Zugleich geht in das Keimmedium eine Substanz über, die reduzierende Eigenschaften besitzt.

4. Unter der Annahme einer von Mehltausporen ausgeschiedenen toxischen Komponente wird die Herabsetzung des Wirkungsgrades von Suspensionen abgestufter Sporenkonzentration und verschiedenen Alters diskutiert.

Literatur.

Allen, P. J., and D. R. Goddard: A respiratory study of powdery mildew of wheat. Amer. J. Bot. **25**, 613 (1938). — Andersen, A. L.: The development of Gibberella Zeae headblight of wheat. Phytopathology **38**, 595 (1948). — Brodie, H. J., and J. F. Jones: The effect of changes of air pressure upon the germination of conidia of barley powdery mildew. Canad. J. Res. Sect. C **24**, 318 (1946). — Brodie, H. J., and C. C. Neufeld: The development and structure of the conidia of Erysiphe polygoni DC and their germination at low humidity. Canad. J. Res. Sect. C **20**, 41 (1942). — Corner, E. J. H.: Observations on resistance to powdery mildews. New Phytolog. **34**, 180 (1935). — Dickson, J. G.: Influence of soil temperature and moisture on the development of the seedling-blight of wheat and corn caused by Gibberella Saubinetii. J. Agr. Res. **23**, 837 (1923). — Doran, W. L.: Effect of external and internal factors on the germination of fungous spores. Bull. Torr. Bot. Club **49**, 313 (1922). — Domsch, K. H.: Über den Einfluß photoperiodischer Behandlung auf die Befallsintensität beim Gerstenmehltau. Arch. Mikrobiol. **19**, 287 (1953). — Gäumann, E.: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Basel 1951. — Glynne, M. D.: Infection experiments with wart disease of potatoes. Synchytrium endobioticum (Schilb.). Perc. Ann. Appl. Biol. **12**, 34 (1925). — Heald, F. D.: The relation of spore load to the per cent of stinking smut appearing in the crop. Phytopathology **11**, 269 (1921). — Metzger, I.: Versuche zur Aufbewahrung lebender Sporen von Weizen- und Gerstenmehltau. Kühn-Archiv **56**, 163 (1942). — Meyer, H.: Über den Einfluß des Cadmiums auf die Krankheitsbereitschaft des Weizens für Erysiphe graminis tritici Marchal. Phytopath. Z. **17**, 63 (1950). — Nover, I.: Untersuchungen über den Weizenmehltau, Erysiphe graminis tritici, im Rahmen der Resistenzzüchtung. Z. Pflanzenzüchtg **24**, 71 (1941). — Pätau, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen. (Eine neue t-Tafel.) Biol. Zbl. **63**, 152 (1943). — Sempio, C.: Difesa, predisposizione e malattia intese come squilibri funzionali. Phytopath. Z. **17**, 287 (1950). — Sempio, C., e M. Castori: Sulla germinabilità dei conidi di Oidium monilioides Link. Riv. Biol. N. S. **42**, 287 (1950). — Stock, F.: Untersuchungen über Keimung und Keimschlauchwachstum der Uredosporen einiger Getreideroste. Phytopath. Z. **3**, 231 (1931). — Tompkins, R. G.: Measuring germination. Transact. Brit. Mycol. Soc. **17**, 147 (1932). — Wilkins, W. H.: Studies in the genus Ustulina with special reference to parasitism III. Spores – germination and infection. Transact. Brit. Mycol. Soc. **22**, 47 (1938).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 176—182 (1954).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster/Westfalen.)

Über das Verhältnis des oxydierten Stickstoffs zum reduzierten Kohlenstoff beim Nitratbildner.

Von

H. Bömeke.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 11. Dezember 1953.)

Wie beim Nitritbildner herrscht auch über das Verhältnis: oxydierter N / assimiliertem C des Nitratbildners große Unstimmigkeit. Coleman (1908) gibt 64/1—41/1 an. Nach Meyerhof (1916) ist der Nutzeffekt der Chemosynthese noch weit ungünstiger. Er berichtet von 100/1 für junge und 135/1 für alte Kulturen. Nelson (1931) fand auf 76 Teile oxydierten Stickstoffs einen Teil assimilierten Kohlenstoffes. Die Angaben differieren hier also genau so wie beim Nitritbildner. Die von Coleman gefundenen C-Werte stehen zu den von Meyerhof etwa im gleichen Verhältnis wie die von mir gefundenen C-Werte bei *Nitrosomas europaea* und *Nitrosomas oligocarbogenes*, nämlich wie 2 : 1 (Bömeke 1951). Zweck der folgenden Untersuchungen war es, den Ursachen dieser divergierenden Werte nachzugehen.

Für meine Untersuchungen am Nitratbildner stand mir diesmal nur ein *Nitrobacter*-Stamm zur Verfügung. Trotz 6jähriger Bemühungen gelang es mir nicht, den aus Boden des Botanischen Gartens in Münster gezüchteten *Nitrobacter*-Stamm „*M*" auf dem Wege der Verdünnungsmethode nach Engel u. Skallau (1937) von seinen Begleitorganismen zu befreien. Die Kultur, mit der ich meine Untersuchungen durchführte, war von Engel u. Skallau aus Boden des Gartens der Landwirtschaftlichen Hochschule in Berlin N isoliert und mir freundlicherweise überlassen worden (siehe auch Bömeke 1948). Dieser *Nitrobacter*-Stamm *14* zeigte während meiner 8jährigen Untersuchungen über den Stoffwechsel der Nitrifikationsbakterien kein Wachstum auf organischen Nährböden wie Bouillon, Hefewasser und den übrigen, von mir geprüften organischen Verbindungen. Er kann daher als Reinkultur angesehen werden.

Die Herstellung und Zusammensetzung der Nährlösung, die Prüfung auf Reinheit der Kultur, die N- und C-Bestimmungen erfolgten nach den von mir beschriebenen Methoden (Bömeke 1948, 1951).

Experimenteller Teil.

1. Eindampfen oder Zentrifugieren der Kulturlösung?

Zur Klärung der Frage, ob man durch Zentrifugieren bezw. Eindampfen der Kulturlösung verschiedene C-Werte erhält, wurde folgender Versuch angesetzt. 7 Rundkolben nach den Angaben von Engel (1929) wurden mit 250 ml der üb-

lichen Nährlösung für den Nitratbildner beschickt. Nach der Sterilisation im Autoklaven bei 1 Atü erfolgte die Beimpfung von 4 Kolben mit einer kleinen Impföse aus einer gut arbeitenden Reinkultur. Die restlichen Kolben blieben unbeimpft und dienten als Kontrolle zur Ermittlung des C-Blindwertes.

Rund 50 Tage nach der Beimpfung wurden die C-Bestimmungen durchgeführt. Die Bakterien in den ersten beiden Rundkolben (Nr. 1 und 2) waren durch Eindampfen, in den beiden anderen (Nr. 3 und 4) durch 10 min dauerndes Zentrifugieren angereichert worden. Weil die durch Zentrifugieren erhaltenen Werte auffallend niedrig ausfielen, wurde außerdem in der abpipettierten Flüssigkeit nach Eindampfen derselben der Kohlenstoff bestimmt. Die C-Blindwerte wurden in der eingedampften unbeimpften Nährlösung ermittelt und ihr Mittelwert (0,960 mg) bei den Kolben Nr. 1—4 in Abzug gebracht.

Die Ergebnisse dieses Versuches bringt Tab. 1. Die durch Eindampfen erhaltenen Kontrollwerte zeigen gute Übereinstimmung. Mit einer Abweichung von $\pm$ 0,05 mg C ist von vornherein zu rechnen. Die zentrifugierten Kulturen liefern ebenfalls gut übereinstimmende Ergebnisse,

Tabelle 1. *Einfluß des Eindampfens bzw. Zentrifugierens.*

Kolben Nr.	Inhalt in cm^3	Oxydierter N in mg	Gefundener C in mg	N/C-Verhältnis	Alter d. Kulturen (Tage)	Art der Analyse
1	250	203	1,962	103,2	50	E
2	„	„	1,914	106,0	51	„
3	„	„	0,913 a) 1,079 b)	101,9	54	Z
4	„	„	0,747 a) 1,137 b)	107,6	55	„
Summe	1000	812	7,752			
Mittelw.				*104,8*	*52,5*	
5	250	203	1,008			E
6	„	„	0,928			„
7	„	„	0,948			„
Mittelw.	250	203	0,960			

E bedeutet „eingedampft", Z bedeutet „zentrifugiert". a) C-Mengen aus dem Zentrifugierrückstand, b) C-Mengen aus der Zentrifugierflüssigkeit. 1—4 geimpft; 5—7 ungeimpft.

wenn wir zu den von den zentrifugierten Kulturen erhaltenen Werten noch die Kohlenstoffmengen addieren, die aus der abpipettierten Kulturflüssigkeit erhalten wurden.

Mit diesem Versuch war erwiesen, daß man mit der Zentrifugiermethode wenigstens bei *Nitrobacter* nicht zu klaren und eindeutigen Ergebnissen gelangen kann. Das Verhältnis von C im Rückstand / C in der Lösung betrug bei Kolben Nr. 3 45,8/54,2 und bei Nr. 4 39,7/60,3. Also rund $^3/_5$ des Kohlenstoffs gingen durch das Zentrifugieren verloren (bzw.

verblieben im Zentrifugat). Daher wurden in der Folge die Bakterien für die C-Bestimmung nur noch durch Eindampfen angereichert.

2. Einfluß der Nährlösungsmengen auf das N/C-Verhältnis.

Um zu prüfen, wie weit die Menge der Nährlösung das Ergebnis beeinflußt, wurden 3 verschieden große Kulturgefäße als Anzuchtkolben mit verschiedenen Nährlösungsmengen gewählt: 750 cm³-Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml, 1 l-Erlenmeyer-Kolben mit 250 ml und tubulierte 3 l-Erlenmeyer-Kolben mit 500 ml Nährlösung. Die Anzucht der Bakterien unterschied sich nicht von der im vorigen Versuch.

Tabelle 2. *Einfluß der Nährlösungsmenge auf das N/C-Verhältnis.*

	Kolben Nr.	Oxydierter N in mg	Gefundener C in mg	N/C-Verhältnis	Alter d. Kultur (Tage)
750 cm³-Kolben mit 100 ml Nährlösung	1	81,2	0,941	86,3	27
	2	„	0,791	102,5	28
	3	„	0,635	127,8	29
	4	„	0,743	109,3	31
	5	„	0,703	115,4	27
	Summe	406,0	3,813		
	Mw.[1]			*106,5*	*28,4*
1 l-Kolben mit 250 ml Nährlös.	6	203,0	1,665	121,9	30
	7	„	2,085	97,4	30
	8	„	1,953	103,8	31
	Summe	609,0	5,703		
	Mw.[1]			*106,8*	*30,3*
3 l-Kolben mit 500 ml Nährlösung	9	406,0	3,580	113,4	52
	10	„	3,688	110,0	53
	Summe	812,0	7,268		
	Mw.[1]			*111,7*	*52,5*
	11	406	4,338	93,6	201
	12	„	3,222	125,9	201
	13	„	4,038	100,5	202
	14	„	3,138	129,5	202
	15	„	3,006	135,0	203
	16	„	3,642	111,3	203
	Summe	2436	21,384		
	Mw.[1]			*113,9*	*202*

[1] Mw. = Mittelwert der Summen des oxydierten N zu gefundenem C.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tab. 2 niedergelegt. Menge und auch Schichttiefe der Kulturlösung haben so gut wie keinen Einfluß auf die Höhe des N/C-Verhältnisses sowie die Genauigkeit der Ergebnisse. Bei den 100 cm³-Kulturen finden wir, wenn wir die beiden Extremwerte ins Auge fassen, eine Schwankung von $\pm$ 0,153 mg C; bei den 250 cm³-Kulturen, wenn wir sie auf 100 cm³ Nährlösung umrechnen $\pm$ 0,84 mg C und bei den 500 cm³-Kulturen $\pm$ 0,133 mg C. Die Ergebnisse der 250 cm³-Kulturen sind nicht so gesichert wie die der anderen Kulturen, da drei Werte in der Regel eine geringere Streuung aufweisen als 5—6 Werte. Nach diesen Ergebnissen ist es also gleichgültig, ob wir 100 oder 500 cm³ Kulturlösung analysieren.

Dagegen ist es wahrscheinlich, daß das Alter der Kultur das N/C-Verhältnis beeinflußt. In den jungen, rund 30 Tage alten und soeben ausnitrifizierten Kulturen finden wir in beiden Fällen etwa dasselbe N/C-Verhältnis als Mittelwert,

nämlich 106/1. In etwa 52 Tage alten Kulturen ist die C-Menge deutlich geringer geworden (N/C = 111/1) und in etwa 200 Tage alten Kulturen noch ein wenig geringer (N/C = 114/1).

Diese Erscheinung deutet auf eine anfänglich rasche, später außerordentlich langsame Veratmung des körpereigenen Kohlenstoffs hin. Es scheint, als ob kurz nach Beendigung der Nitritoxydation der Baustoffwechsel noch nicht völlig abgeschlossen ist, so daß die Zellen vielleicht noch wachsen und sich teilen. Später wird dann vermutlich der Baustoffwechsel eingestellt und der Betriebsstoffwechsel allein übrig bleiben, für den die Bakterien anscheinend weit weniger Energie benötigen und daher auch geringe C-Mengen veratmen. Diese Deutung des späteren geringeren C-Verlustes findet eine Stütze in den Beobachtungen über Restatmung, bei der zu Anfang in gleichen Zeiträumen mehr O_2 aufgenommen wird als später (vgl. Bömeke 1939).

3. Einfluß der Schichttiefe auf das N/C-Verhältnis.

Schon die oben besprochene Versuchsserie hatte wahrscheinlich gemacht, daß der Schichttiefe kein entscheidender Einfluß auf den chemosynthetischen Nutzeffekt der Bakterien zukommt. Da aber Kulturgefäße von verschiedener Größe genommen wurden und somit die Verhältnisse nicht genau vergleichbar waren, wiederholte ich den Versuch mit Gefäßen gleicher Größe, aber mit verschiedenen Nährlösungsmengen und damit unterschiedlicher Schichttiefe.

Kultiviert wurden die Bakterien wieder wie bislang. Als Anzuchtgefäße dienten 750 cm³-Erlenmeyer-Kolben mit 150, 300 und 450 ml Nährlösung. Die durch die verschiedenen Mengen Nährlösung entstandenen Schichttiefen sind in der Tab. 3 in Zentimetern angegeben. Die Nährlösung für sämtliche Kulturen stammte aus der gleichen Vorratsflasche, wurde am gleichen Tage beimpft und stand während der Nitrifikation im gleichen

Tabelle 3. *Einfluß der Schichttiefe auf das N/C-Verhältnis.*

Kolben Nr.	Schichttiefe in cm³	Oxydierter N in mg	Gefundener C in mg	N/C-Verhältnis	Alter d. Kultur (Tage)
1	1,8	121,8	1,068	113,9	54
2	„	„	1,110	109,4	55
3	„	„	1,164	104,4	56
Summe		365,4	3,342		
Mw.[1]				*109,2*	*55*
4	3,5	243,6	2,094	116,0	58
5	„	„	2,238	108,8	59
6	„	„	2,082	116,7	60
7	„	„	2,364	102,8	60
Summe		974,4	8,778		
Mw.[1]				*111,0*	*59,3*
8	5,4	365,4	3,198	114,5	61
9	„	„	3,244	112,8	62
10	„	„	3,340	109,6	63
Summe		1096,2	9,782		
Mw.[1]				*112,0*	*62*

[1] Mw. = Mittelwert der Summen des oxydierten N zu gefundenem C.

Tabelle 4. *Einfluß des Alterns der Kultur auf das N/C-Verhältnis.*

Kolben Nr.	Oxydierter N in mg	Gefundener C in mg	N/C-Verhältnis	Alter d. Kultur (Tage)
1	121,8	1,134	107,2	20
2	„	1,158	105,1	23
3	243,6[1]	2,352	103,5	23
4	„ [1]	2,148	113,1	23
5	121,8	1,062	114,8	24
6	„	1,122	108,5	24
7	„	1,284	94,9	24
8	„	1,038	117,4	25
9	„	1,290	94,4	25
10	„	1,266	96,3	26
11	„	1,224	99,4	26
12	„	1,254	97,1	28
13	„	1,416	86,2	29
14	„	1,054	115,4	29
Summe	1948,8	18,802		
Mw.			*103,1*	*24,9*
15	121,8	1,071	113,5	53
16	„	1,137	107,1	53
17	„	1,143	106,3	54
Summe	365,4	3,351		
Mw.			*109,0*	*53,3*
18	121,8	1,064	114,0	104
19	„	1,088	111,3	104
20	„	1,160	109,1	105
21	„	1,174	109,0	105
22	„	0,950	127,7	106
Summe	609,0	5,436		
Mw.			*112,0*	*104,8*
23	121,8	1,044	116,4	123
24	„	1,116	109,0	123
Summe	243,6	2,160		
Mw.			*112,7*	*123*
25	121,8	1,052	115,6	215
26	„	1,118	109,0	216
Summe	243,6	2,170		
Mw.			*112,1*	*215,5*

[1] 2 Kolben zur Analyse verwendet.

Thermostaten. Die Kulturbedingungen waren also völlig gleich. Unterschiedlich war nur die Nährlösungsmenge und damit gekoppelt die Schichttiefe. Zwischen dem 54. und 63. Tage seit der Beimpfung der Nährlösung wurden die C-Bestimmungen durchgeführt.

Das Ergebnis (Tab. 3) zeigt in der Tat bei den Kulturen mit niedriger Schichttiefe ein günstigeres, bei den Kulturen mit größerer Schichttiefe ein ungünstigeres N/C-Verhältnis. Die Unterschiede der Mittelwerte sind allerdings so gering und die Streuung der Einzelwerte ist so groß, daß dem Ergebnis eine nur geringe Sicherheit innewohnt. Zudem sind die Kulturen mit der geringeren Schichttiefe zuerst und die mit der größeren zuletzt analysiert worden. Es könnte somit auch die Zeitdifferenz von 9 Tagen zu einer ähnlichen Abstufung der Werte führen wie die verschiedene Schichttiefe (= verschiedene O_2-Versorgung). Ob das eine oder das andere mehr oder weniger, oder ob beides zutrifft, läßt sich aus obigem Versuch nicht erkennen.

Auffallend ist ferner, daß das N/C-Verhältnis in diesen Kulturen annähernd mit dem der gleichaltrigen Kultur des vorigen Versuches (siehe Tab. 2) übereinstimmt. Die 52 Tage-Kultur hat ein N/C-Verhältnis von 111/1, der Mittelwert sämtlicher Analysenwerte der 59 Tage-Kultur der Tab. 3 ergibt ebenfalls ein N/C-Verhältnis von 111/1.

4. Der Einfluß des Alterns der Kultur auf das N/C-Verhältnis.

Schon die bisher besprochenen Versuche hatten gezeigt, daß junge, gerade ausnitrifizierte Kulturen kohlen-

stoffreicher sind als alte, bereits hungernde. Diese Erscheinung steht mit entsprechenden Beobachtungen von Meyerhof (1916) und Hes (1937) im Einklang. Sie ist auch eine Bestätigung meiner früheren Beobachtungen (Bömeke, 1939) über den respiratorischen Gaswechsel nitrifizierender Bakterien im Hungerzustand insofern, als bei Vorhandensein eines solchen die Kulturen allmählich an C verarmen müssen.

Um hierüber noch mehr Beweismaterial beizubringen, setzte ich erneut eine Anzahl Kulturen an und analysierte sie nach bestimmten Tagen. Sämtliche Kulturgefäße waren 750 cm³-Erlenmeyer-Kolben mit 150 ml Nährlösung. Kulturbedingungen und analytische Methode waren die gleichen wie bei den vorigen Versuchen.

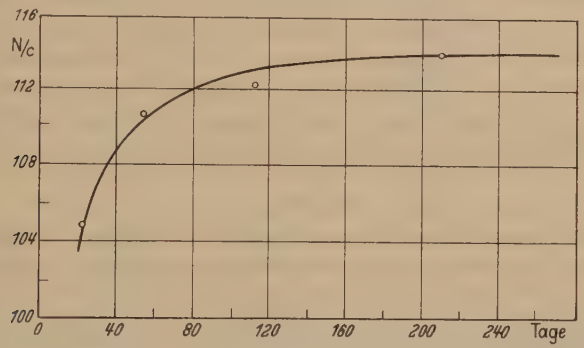


Abb. 1. Abhängigkeit des N/C-Verhältnisses vom Alter der *Nitrobacter*-Kultur.

Überblicken wir die Ergebnisse dieses Versuches (Tab. 4), so erkennen wir eindeutig eine Kohlenstoffabnahme mit zunehmendem Alter der Kulturen. Da die Bakterien zu verschiedenen Zeiten und in wiederholt angesetzten Nährlösungen gezüchtet wurden, treten zwar größere Schwankungen auf, lassen sich aber trotzdem im großen und ganzen in das bisher gewonnene Schema einordnen.

Das günstigere N/C-Verhältnis in jungen Kulturen im Vergleich zu älteren ist nach den vorliegenden Analysenergebnissen nicht mehr von der Hand zu weisen. Eine Verschlechterung der Ausnutzung der Nitritoxydation durch Anhäufung von Stoffwechsel-Endprodukten (Nitrite bzw. Nitrate), wie Meyerhof und Hes annahmen, kann nicht die Ursache dafür sein, da bei meiner Versuchsanordnung die jungen Kulturen in gleicher Weise zu Ende nitrifizierten wie die alten. Meines Erachtens kann nur der dissimilatorische Stoffwechsel für das Absinken der C-Werte in älteren Kulturen verantwortlich gemacht werden.

Abschließend sei noch in einer graphischen Darstellung eine Zusammenfassung sämtlicher C-Werte nach 4 Altersgruppen gebracht (Abb. 1), welche die Abnahme des Kohlenstoffes in den *Nitrobacter*-Zellen mit zunehmendem Alter der Kulturen veranschaulicht. Wenn die Unterschiede

in den N/C-Verhältnissen auch gering sind, so muß man ihnen doch Beachtung schenken, weil die Werte sich in einer fast idealen Kurve anordnen lassen und dadurch an Wahrscheinlichkeit gewinnen.

Die von Meyerhof (1916) gefundenen Werte von 100/1 bis 135/1 stimmen einigermaßen mit meinem überein. Der in die Literatur eingegangene N/C-Wert von 135/1 dürfte allerdings zu ungünstig und mit anderen Anzuchtmethoden zu erklären sein.

Zusammenfassung.

Auf Grund von 56 Analysen wurde gefunden, daß der C-Wert der *Nitrobacter*-Zellen nicht ganz konstant ist. Er nimmt anfangs rasch, später langsam ab. Die Folge davon ist eine Verschiebung des Verhältnisses oxydierter N / assimiliertem C, und zwar etwa wie folgt: 25 Tage alte Kulturen 105/1, 50 Tage alte Kulturen 110/1, 100 Tage alte Kulturen 112/1, 200 Tage alte Kulturen 114/1. Daraus wird gefolgert, daß die autotrophen *Nitrobacter*-Zellen einen dissimilatorischen Stoffwechsel besitzen und organische, körpereigene Stoffe abbauen können.

Literatur.

Bömeke, H.: Arch. Mikrobiol. **10**, 385 (1939); **14**, 63 (1948); **15**, 414 (1951). — Coleman, L. C.: Zbl. Bakter. II Orig. **20**, 401 (1908). — Engel, H.: Planta (Berl.) **8**, 423 (1929). — Engel, H., u. W. Skallau: Zbl. Bakter. II Orig. **97**, 305 (1937). — Hes, J. W.: Rec. Trav. bot. néerl. **34**, 233 (1937). — Meyerhof, O.: Pflügers Arch. **164**, 354 (1916). — Nelson, D. H.: Zbl. Bakter. II Orig. **83**, 280 (1931).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 183—200 (1954).

(From the Cytogenetics Laboratory, Department of Biochemistry,
Indian Institute of Science, Bangalore-3.)

Studies on the Cytology of Yeasts.

IX. Cytology of Cells from a two-day old Giant Colony.

By
T. R. Thiagarajan, B. Sc., A. I. I. Sc.
and
M. K. Subramaniam, M. A., D. Sc.

With 27 photos and 31 figures in the text.

(Eingegangen am 12. Dezember 1953.)

A survey of the literature on yeast cytology gives one the impression (Subramaniam, 1952; Prahlada Rao and Subramaniam, 1953) that there is a persistent belief amounting to a conviction that yeast cells should exhibit a uniform cytological behaviour irrespective of the cultural conditions. The validity of such an assumption is capable of easy experimental verification. Yeasts could be cultured in liquid or solid media. Their inherent capacity for oxidative and fermentative modes of existence and the ease with which an aerobically growing culture becomes fermentative under conditions of anaerobiosis posed therefore the following problems: 1) Is the cytology of yeast unique in that radical alterations in metabolism find no reflection in the behaviour of the nucleus? 2) If not, what are the cytological changes that accompany a shift from aero- to anaero-biosis or vice versa? 3) Are these changes capable of being compared and correlated with the cytological changes reported in higher organisms during tissue differentiation?

In order to elucidate these problems Subramaniam (1946, 1948a, 1948b) carried out a series of experiments on the two radically different physiological states of our control strain of yeast. It was believed that a comparison of cells actively dividing in well aerated liquid media with those from a five day old liquid culture where all available nutriment would have been exhausted during fermentation would give an indication of the cytological changes, if any, accompanying different metabolic states. It was discovered that during active aerobic proliferation under optimal conditions the cells show normal mitosis and have two chromosomes (Subramaniam and Ranganathan, 1945; Subramaniam, 1946). Further investigations have not only confirmed the earlier reports on its chromosome number but have also shown that the strain has retained its characteristic mitotic behaviour for the past seven years (Duraiswami and Subramaniam, 1951; Duraiswami, 1953).

In a five-day old fermenting culture owing to the non-availability of nutrients, the cells are apparently in a resting condition. Direct smears did not give a correct

idea of the nuclear structure in these cells. They were therefore stimulated to divide by discarding the spent medium and adding fresh wort. Observations were confined to the first cycle of division after the change of medium. The Feulgen-stained slides showed an ascending grade of chromosome number (Subramaniam, 1947, 1948b). This entirely different cytological picture was interpreted as the result of "endopolyploidy".

Subramaniam was the first to record endopolyploidy in yeast. A preliminary communication on the subject appeared in the year 1947. The detailed account which was published in the following year gave a guarded description of the phenomenon. The cautious approach was necessitated by the fact that it was the first report on the occurrence of endopolyploidy in a micro-organism. The discovery that fermenting cells are endopolyploid opened up a new field for investigation and raised several problems viz: 1) Is endopolyploidy limited to fermenting cells alone or does it occur also in cells growing as streaks on agar slants or as giant colonies in wort-agar plates? 2) If endopolyploidy occurs in cells cultured under a variety of physiological conditions, is the complexity of chromosomal constitution the result of endomitosis? 3) How does growth occur in a culture where the majority of the cells are endopolyploid? 4) If endopolyploid cells do divide, is there a regular segregation of the chromosomes into equal complements? 5) How does a culture composed mainly of endopolyploid cells transform itself under optimal aerobic conditions, into one of mitotically dividing diploid cells having only two chromosomes? 6) Is there a somatic reduction of chromosome number when cells from fermenting cultures are transferred to aerated media?

The investigations reported in the present paper form part of an extensive programme designed to elucidate answers to these questions. When work on the above problems was in progress, there appeared the first of a series of stimulating contributions from the school led by Huskins (1947, 1948 a, b). The interesting nature of these discoveries and the important bearing they have on similar phenomena in yeast necessitated a postponement of the publication of our results in order to enable a comparison and correct appraisal.

The Problem, Material and Methods.

Under aerobic conditions the control diploid brewery yeast, *BY 1*, shows normal mitosis characteristic of a two chromosome strain (Duraiswami and Subramaniam, 1951). If a few such mitotically dividing cells from an aerobically growing liquid culture are transferred to the centre of the special agar medium (Subramaniam, Ranganathan and Krishna Murthy, 1948) in a Petri dish, a giant colony having a diameter of 2.5 to 3.0 cms. develops in the course of 15 days. Smears of samples from a ten day old giant colony indicated that the majority of cells are endopolyploid. However, the very large number of cells which go to make up the fully grown giant colony must be the product of repeated proliferation of the few mitotically dividing cells introduced as inoculum.

This reproduction of the cells during the growth of the colony raises the following questions: 1. At what stage in the development of the colony do the mitotically dividing cells become endopolyploid and what is

the mechanism by which this is achieved? 2) If the cells become endopolyploid even during the early phases of growth, the yeast population would be heterogeneous in their cytological characteristics. In such a case, is the subsequent growth the result of the activity of cytologically different types of cells or is it the consequence of the proliferation of a small percentage of vegetative mitotically dividing two chromosome cells? In other words, as in glandular tissues of higher animals, are there in a growing giant colony, cells comparable to the undifferentiated replacement cells? To answer these questions smears were made directly from 48 hour old giant colonies.

Since cells growing as a giant colony appear to utilise only that nutriment which is available in the immediate vicinity, the size to which the colony grows is governed by the percentage of sugar in the wort used for compounding the agar medium and also by the actual depth of the wort-agar in the petri dish itself. To obtain proper growth the wort had to contain 5% or more of sugar and the depth of the medium in the petri dish had to be at least 1 cm. Barley malt wort prepared according to the routine procedure in this laboratory (Subramaniam, 1948a; Subramaniam, Ranganathan and Krishna Murthy, 1948) was adjusted to a specific gravity of 1.048 and a p_H of 6.8. After the addition of agar to constitute 2%, the medium was sterilized at 5 lbs. steam pressure for 30 min. The hot liquid was filtered through glass wool and distributed in 15 ml. aliquots to sterile test tubes, which were again sterilized at 10 lbs. for half an hour. Petri dishes having a diameter of 8 cms. were sterilized at 20 lbs. for one hour and later dried in the hot air oven at 100° C for 12 hours. To each such petri dish, the contents of three wort-agar tubes were added to give a depth of 1 cm. The experimental procedure followed for the giant colony inoculations has already been described (Subramaniam and Sreepathi Rao, 1952).

Since the present investigation had an entirely different objective, 15 inoculations on each petri dish were made equidistant from one another. These inoculations were carried out inside a sterile chamber. The 48 hour old colonies measured 0.7 to 0.8 cms. in diameter. The material from each colony was transferred loop-wise to a drop of wort on a slide, mixed thoroughly with the liquid and smeared one cell thick. To obtain a correct idea of the cytological characteristics of the cells, smearing was continued for one hour. After fixation in the usual manner in osmium tetroxide vapour and repeated transfers through 70% alcohol for five to six days, they were stained by the Feulgen technique (Subramaniam, 1948a).

Observations.

A variety of cell organelles have been reported to be present in yeast cells. Apart from the nucleus, volutin and metachromatic granules are said to occur (Guilliermond, 1920). The use to which these terms have been put in literature indicates considerable confusion in the minds of the earlier investigators as to the identification and characterisation of these two structures (Guilliermond, 1920; Wager and Peniston, 1910; Brandt, 1941; Nagel 1948; Lindegren, 1949). To avoid any confusion with possible cytoplasmic inclusions, reliance was placed entirely on the Feulgen technique to identify the chromatin. This was in conformity with the accepted belief expressed by Mirsky (1951) that "DNA must

have a special significance for chromosomes since it is always present in them and in no other part of the cell" (p. 128).

The most salient point which emerged from an examination of the preparations was that only periodically do the nuclei show any activity

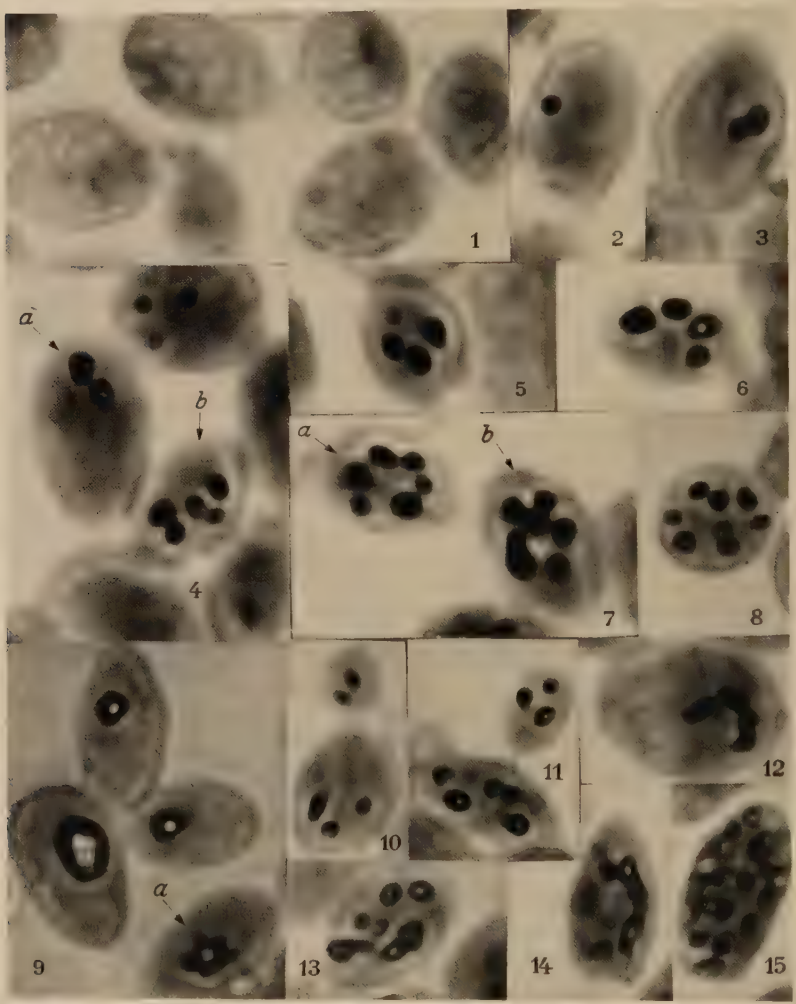


Photo 1—15.

During the period of rest the cells (photo 1) were bereft of any structure that could be identified as chromatin or chromosomes. The protoplasm of such cells exhibited a differential affinity for the counter stain, light green. A specific area in each cell showed a deeper staining suggesting that it might be the nucleus. But critical identification was not possible

owing to the absence of any internal structure. When stained bodies did appear in the cell, the population even in a single field showed a bewildering array of pictures.

On analysis these were capable of being arranged in an ascending order of complexity. The least complex cytological picture is presented by a cell having a Feulgen positive chromatin grain surrounded by a hyaline area (photo 2; Fig. 1). From what is known about the behaviour of the nucleus during mitosis (SUBRAMANIAM, 1946; DURAISWAMI, 1953) this

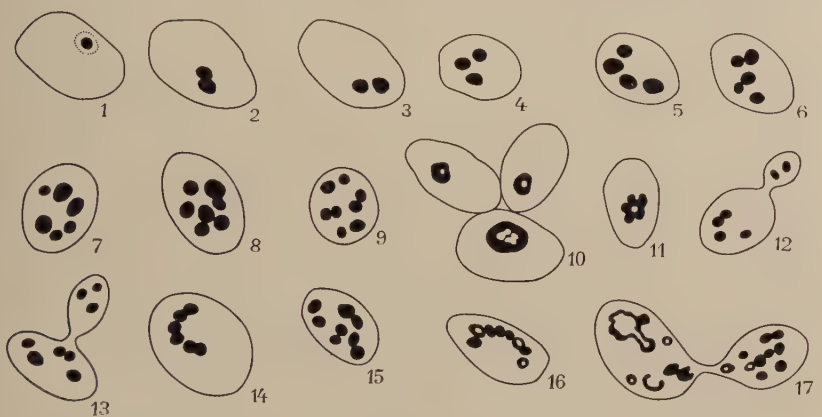


Fig. 1—17.

Photo 1. Resting cells without any stained bodies. Biggest Cell. (4.8 μ.)

Photo 2. (Fig. 1.) Early prophase with a single chromatin grain. Note the hyaline area separating it from the cytoplasm. (3.6 μ.)

Photo 3. (Fig. 2.) Mid-prophase. The single chromatin mass dividing into two equal sized bodies (4.5 μ.)

Photo 4*a*. (Fig. 3.) Early metaphase showing two chromosomes. (4.8 μ.)

Photo 4*b*. (Fig. 6.) Cell with five chromosomes. (3.6 μ.)

Photo 5. (Fig. 4.) Cell with three chromosomes. (3.2 μ.)

Photo 6. (Fig. 5.) Early anaphase of the diploid showing four daughter chromosomes. (3.2 μ.)

Photo 7*a* and 7*b*. (Figs. 7 and 8.) Cells with six and seven Feulgen-positive bodies. The larger bodies may be compound. (4.0 μ and 4.8 μ.)

Photo 8. (Fig. 9.) Cell with eight chromosomes. (4.4 μ.)

Photo 9. (Fig. 10.) Telophase nuclei of differing sizes. Biggest cell. (5.6 μ.)

Photo 9*a*. (Fig. 11.) Prophase. Six bodies disposed in the form of a circle. (5.0 μ.)

Photo 10. (Fig. 12.) Two chromosomes in the bud and three in the mother cell. The third elongated body shows a constriction in the middle. Mother cell with bud. (6.4 μ.)

Photo 11. (Fig. 13.) The mother cell has five chromosomes while three are present in the bud. Some of the bodies are bigger in size. Mother cell with bud. (6.0 μ.)

Photo 12. (Fig. 14.) Early telophase. Six bodies orientated in the form of an arc are synapsing in pairs. The secondary attraction between them has led to the commencement of fusion of two pairs. (5.2 μ.)

Photo 13. (Fig. 15.) The eight chromosomes showing various stages of somatic pairing and synapsis. (4.8 μ.)

Photo 14. (Fig. 16.) An advanced stage of nuclear reconstitution by eight chromosomes. Only two of the chromosomes are discrete. (5.2 μ.)

Photo 15. (Fig. 18, p. 191.) Cell showing more than twenty chromosomes lying scattered throughout the cytoplasm. Some of them are out of focus. (6.0 μ.)

could be identified as an early prophase stage. The chromatin mass in photo 3 (Fig. 2) shows a constriction dividing it into two equal sized bodies. The hyaline area surrounding it suggests that the nuclear membrane may still be intact. If the constriction is followed by the separation of the two bodies, the disposition would be that seen in cell *a* in photo 4 (Fig. 3). The two Feulgen positive chromosomes lying near each other have no hyaline area surrounding them. They should therefore be lying free in the cytoplasm.

The reproduction of these chromosomes does not appear to be synchronous since odd numbers are seen. In photo 5 (Fig. 4) the cell has only three chromosomes. The configuration seen in photo 6 (Fig. 5) is reminiscent of the early anaphase of the diploid in normal mitosis and can be derived from that observed at *a* in photo 4 (Fig. 3). It is rather difficult to decide whether the four chromosomes originated as a result of simultaneous or a successive division of the two chromosomes illustrated at *a* in photo 4 (Fig. 3). The reproduction of the chromosomes continues in an irregular fashion. Cell *b* in photo 4 (Fig. 6) shows five chromosomes while the cells *a* and *b* in photo 7 (Figs. 7 and 8) show six and seven bodies respectively. Lack of uniformity in the size of the chromosomes leads to the presumption that the larger bodies may be compound.

If all the four chromosomes in photo 6 (Fig. 5) reproduce, then there would result a cell having eight chromosomes (photo 8; Fig. 9). It is doubtful whether the eight chromosomes seen in photo 8 are the result of repeated and uninterrupted division of the single chromatin mass seen in photo 2 (Fig. 1) or whether an interphase intervenes at a stage corresponding to that illustrated in photo 6 (Fig. 5), this latter being followed by one more division.

The presence in the smear of cells with telophase nuclei of differing sizes (photo 9; Fig. 10) indicates that at regular intervals during the course of the division of chromosomes to give rise to the multiples characteristic of endopolyploidy, the cells may go through a resting stage. In view of this, the second alternative appears more feasible. If periodically after reaching particular stages of complexity, the nuclei lapse into the resting condition, then theoretical consideration suggests that when such nuclei again start on their next cycle of chromosome reproduction, they should pass through the earlier stages where the chromatin mass breaks up into its constituent components as illustrated for the two chromosome conditions (Figs. 1, 2 and 3). The changes seen in telophase should occur in a reverse order during the succeeding prophase. This feature renders definite identification of the prophase stages rather difficult. The arrangements illustrated by cell *a* in photo 9 (Fig. 11) shows six bodies disposed in a circle. This may be a prophase of the hexaploid

stage since no primary or secondary attraction between the chromosomes could be distinguished.

Bud formation does not appear to be correlated in any manner with the number of chromosomes in the cell. The bud in photo 10 (Fig. 12) has two chromosomes while the mother cell shows three bodies, two of which are discrete. The third body is elongated and possesses a constriction in the middle. One can, therefore, conclude that there are four chromosomes in the mother cell. In photo 11 (Fig. 13) on the other hand, the mother cell has five bodies while three are present in the bud.

A perusal of photos 6, 7, 10 and 11 (Figs. 5, 7, 8, 12 and 13) clearly indicates the differences in size of the Feulgen positive bodies. The elongated dumb-bell shaped structure in photo 10 (cf. Fig. 12) is quite clearly compound in nature since the constriction delineates the two individual chromosomes. In the other cases however, it is difficult to decide whether the differences in the size of the constituent chromosomes are due to the characteristic loosening up of their structure at post-anaphase prior to reconstitution of nuclei or to their being compound in structure. Further evidence of a more critical nature is awaited.

Reconstitution of a nucleus is by the synapsis of all the chromosomes. The six bodies orientated in the form of a horse-shoe in photo 12 (Fig. 14) could be considered as being in an early telophase stage. There appears to be a primary attraction between pairs of chromosomes and a secondary one between groups of fused chromosomes. As may be seen, the six bodies have synapsed into three pairs and the secondary attraction between them has led to two of the pairs commencing to fuse with one another. The disposition of the third pair in close apposition may be taken as indicative of its tendency to merge into the group of fused chromosomes.

The eight chromosomes observed in photo 13 (Fig. 15) show various stages of somatic pairing and synapsis. The two discrete chromosomes at the top appear to have commenced pairing. The two pairs situated at the base are in actual synapsis. The fact that the forces of pairing and synapsis are active among the chromosomes strongly suggests that the cell is about to revert to the resting condition. What is presumably the sequel is shown in photo 14 (Fig. 16) where as a result of active secondary attraction between the synapsed chromosome pairs, an arc like arrangement analogous to the one illustrated in the case of the hexaploid (photo 12; Fig. 14) has taken place. Only two of the chromosomes are still discrete and they are to be found at each end of the arc.

Repeated reduplication results in cells showing large numbers of chromosomes. Exact counts become difficult above a particular stage. Twenty bodies lying scattered throughout the cytoplasm could be counted in the cell in photo 15 (Fig. 18, p. 191). Since they were not all in the same optical plane, it was not possible to obtain a single photograph with all

of them in focus. Curiously enough such highly endopolyploid cells do often produce buds. Almost equal complements seem to be present in the mother cell and the bud in photo 16 (Fig. 17). However, the onset of

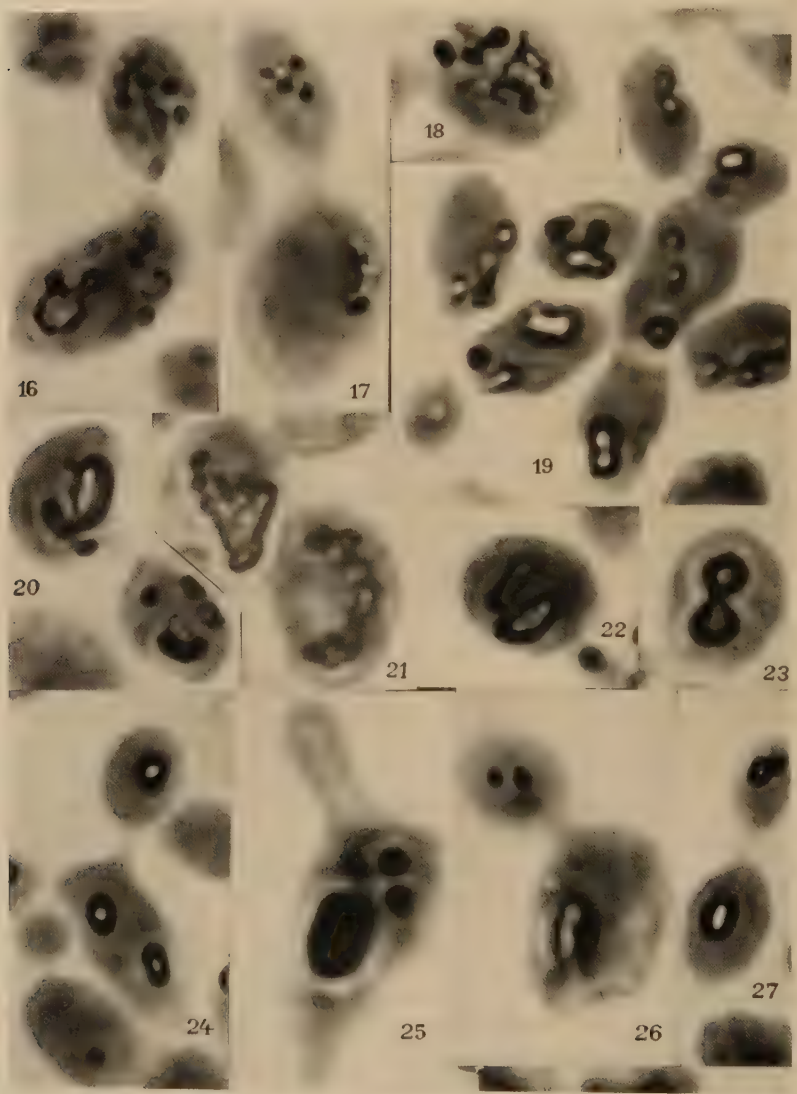


Photo 16–27.

telophase appears to have given rise to chromatin masses having varying configurations resulting from the fusion of two or more chromosomes. In photo 17 (Fig. 19), on the other hand, the segregation is into unequal

complements. There are only four chromosomes in the bud. Nuclear reconstitution is in progress in the mother cell and would be complete only when the single chromosome lying very near the irregularly shaped chromatin mass fuses with it.

In cells having higher multiples, the chromosomes exhibit a tendency to fuse in groups obscuring the characteristic major attraction between individuals of a pair. This leads to the appearance of rather complex pictures. Judged in the context of the lack of any synchronisation in chromosome reproduction, the regularity which characterises the telophasic changes is rather surprising. The commencement of telophase is heralded by the sudden development of an attraction between pairs or groups of chromosomes (photo 18; Fig. 20). The resulting fusion leads to

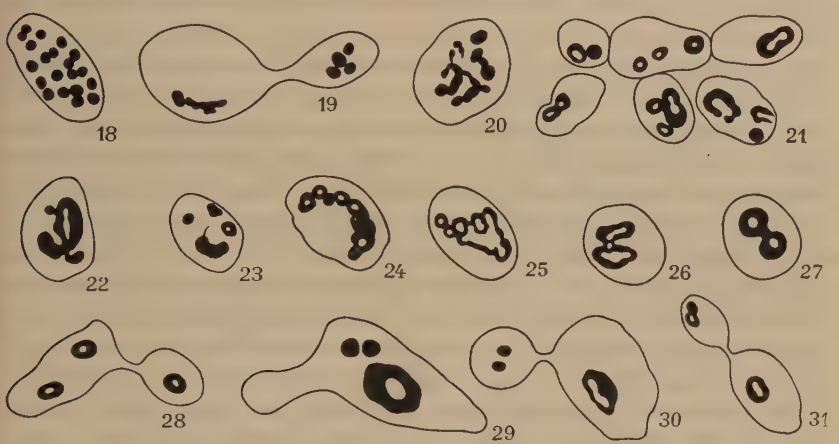


Fig. 18—31

Photo 16. (Fig. 17.) Budding cell showing almost equal complements with varying dispositions in the mother cell and bud. Mother cell with bud. (11.2 μ.)

Photo 17. (Fig. 19.) Example of unequal segregation. There are four chromosomes in the bud while the mother cell has an irregularly shaped large chromatin mass. Mother cell with bud. (11.4 μ.)

Photo 18. (Fig. 20.) Early telophase showing a chromatin mass formed by the fusion of the chromosomes. (5.2 μ.)

Photo 19. (Fig. 21.) The eight cells show late stages of fusion of chromatin masses at telophase. Note their progressive decrease in number and their irregular shape. Biggest cell. (5.6 μ.)

Photo 20. (Figs. 22 and 23.) Cells with fused chromatin masses of varying sizes. Bigger cell. (4.4 μ.)

Photo 21. (Figs. 24 and 25.) Reconstituting nuclei with irregular shapes. Bigger cell. (4.8 μ.)

Photo 22. (Fig. 26.) do. (4.0 μ.)

Photo 23. (Fig. 27.) Amitosis-like phenomena occurring during the final stages of telophase. (4.0 μ.)

Photo 24. (Fig. 28.) Two nuclei are present in the mother cell. The bud has only one. Mother cell with bud. (8.0 μ.)

Photo 25. (Fig. 29.) Budding cell showing a huge nucleus with two discrete chromosomes lying separated from it. Mother cell with bud. (9.6 μ.)

Photo 26. (Fig. 30.) The bud has two chromosomes while the mother cell has a complex nucleus. Mother cell with bud. (7.2 μ.)

Photo 27. (Fig. 31.) Advanced stage of somatic reduction. There is a well defined nucleus in the mother cell while the two chromosomes in the bud are just commencing to synapse. Mother cell with bud. (8.0 μ.)

a reduction in the number of Feulgen stained bodies with a simultaneous increase in their size. We thus get irregular sized chromatin masses which begin immediately to fuse with one another (photo 19; Fig. 21). The eight cells in photo 19 are illustrative not only of the varying sizes and dispositions of the Feulgen positive structures but also of the progressive decrease in their number. At this stage chromatin masses are apt to be mistaken for micronuclei. That they are not micronuclei is indicated by the fact that they only represent a transitory stage in telophase.

The progressive fusion of the scattered micronuclei like structures (photo 20; Figs. 22 and 23) leads to the formation of a single nucleus which at first sight may have an irregular or bizarre shape (photos 21 and 22; Figs. 24, 25 and 26). During the last phases of reconstitution, pictures suggestive of amitosis are of common occurrence. Guilliermond (1920) repeatedly emphasized that yeast nuclei divide by amitosis. Taken out of context, photos 22 and 23 (Figs. 26 and 27) could be interpreted as examples of amitosis but when judged from the general occurrence of a synaptic attraction, these stages appear to be merely the culmination of the fusion of the chromosomes. In an earlier contribution Subramaniam (1948b) accepting Guilliermond's observations conceded the possibility that highly endopolyploid nuclei may exhibit amitotic phenomena. The extensive analysis of the telophasic reconstitution of nuclear material in endopolyploid cells described here necessitates a rejection of the previous interpretation. Amitosis does not occur among endopolyploid cells.

The irregular shape of the nucleus immediately on reconstitution (photo 21; Figs. 24 and 25) is also transitory. It soon assumes the characteristic spherical shape and stains brilliantly with leuco-basic fuchsin (photo 9; Fig. 10). It has been very difficult to decide whether as in telophase of normal mitosis (Duraiswami, 1953), there is a progressive reduction in the size of the chromatin mass as a prelude to reversion to the resting condition. The diversity in the chromosome complexity of the population complicates issues. For example, the nuclei in the cells in photo 9 are of different sizes. They may have originated by the fusion of differing numbers of chromosomes. On the other hand, they may illustrate equally well the progressive reduction in size of the chromatin mass at late telophase.

If the sequence of changes at telophase does not differ among cells differing in their degree of endopolyploidy, then it should be difficult to locate successive stages of any particular type. The highly endopolyploid nucleus before lapsing into the resting condition may exhibit a chromatin mass equal in size to that just reconstituted by a cell of a very low grade of complexity. Instances are not wanting where a cell comes to possess more than one nucleus. If such a cell produces a bud, only one nucleus migrates into it (photo 24; Fig. 28).

If endopolyploidy is the mechanism by which the yeast cells attain the ability to survive what are comparatively abnormal physiological conditions, it appears that the organism has at the same time developed the means to return to normal mitotic behaviour when conditions become favourable. The unmodified cells occurring in glandular tissues of higher animals are said to have a specific function. The products of their division replace those cells which die and disintegrate after varying periods of activity. By analogy, when a yeast cell becomes endopolyploid, it is legitimate to presume that its activity can only be for a limited duration. Highly endopolyploid cells are on the road to death. Periodically they have to be replaced by a fresh crop of cells.

During the metamorphosis of *Culex* (Berger, 1938; Grell, 1946) endopolyploid cells have been reported to undergo repeated somatic reduction to produce pluripotent cells for subsequent regeneration. Prahlada Rao and Subramaniam (1952) reported a peculiar method of somatic reduction. An endopolyploid cell was shown to give rise to a bud with two chromosomes. An identical type of somatic reduction was observed in the cells from giant colonies also. The budding cell in photo 25 (Fig. 29) shows a huge nucleus and two discrete chromosomes lying near it. The bud in photo 26 (Fig. 30) has two chromosomes while the complex nucleus of the mother cell is *en route* to lapsing into the resting condition. The mother cell-bud combination in photo 27 (Fig. 31) is an example of an advanced stage of somatic reduction. There is a well defined nucleus in the mother cell while the two chromosomes in the bud are just commencing to synapse.

The difference in the size of the nuclei in the mother cells in photos 25, 26 and 27 (Figs. 29, 30 and 31) could be taken as evidence that the formation of buds with only two chromosomes occurs in cells at different stages of chromosome complexity. These few buds with the normal complements may be the fore-runners of the purely diploid population that one observes when conditions become ideal for mitosis. Occurring as they do in an unfavourable environment, it is problematical whether they could persist and continue to divide by normal mitosis. At best, they may pass through a few mitotic cycles. In order to retain their foot-hold they have to become endopolyploid. Naturally, they remind one of the replacement cells in glandular tissues.

Discussion.

a. Endopolyploidy.

It is now being slowly realised that tissue differentiation in higher plants and animals is accompanied by changes in the nuclei making them more complex (Lorz, 1947; White, 1951). The regular occurrence of the phenomenon of mitosis in dividing cells of higher organisms led

Hertwig to formulate the law of the constancy of chromosome number in plants and animals. Since differentiated cells divide but rarely, there was some justification for the above conclusion. However, even during the early years of the present century, there were reports of the occurence of polyploid nuclei among normally dividing cells. Their rarity led Strasburger to dismiss them as of little significance.

Following in the wake of the leader, no attempt was made by others to study their origin or behaviour. Winkler on the other hand does not appear to have shared the views of Strasburger and is said to have remarked:

"It shows that the conviction that in normal somatic tissues only diploid cells could occur has become a dogma under the influence of which the best plant cytologist comes at once to the opinion that the occurrence of tetraploid cells found therein must be pathological without even considering any other possibilities" (Huskins, 1952, p. 13). He is of the view that "the regular occurrence of polyploid cells in the somatic tissues of higher plants by no means refutes the laws of constancy of chromosome number but must be expected in view of the importance of chromosome number for cell size" (Huskins, 1952, p. 13).

The standard for comparison of the cytological variations in the tissues of higher organisms has thus always been the regular mitosis easily seen in the meristematic or embryonic cells. But yet, in spite of the availability of such a standard, an interpretation of the peculiar structure of the chromosomes in the salivary glands of *Chironomus* reported by Balbiani had to wait almost fifty years. New techniques and newer methods of approach had to be developed to identify them as polytene.

Remarkably enough, in yeast, we meet with a different state of affairs. Yeast cells proliferate under a variety of physiological conditions. The general assumption of yeast workers (Winge, 1951; Lindegren, 1952) that all budding cells should exhibit a uniform cytological behaviour could not be confirmed by the extended series of investigations in this laboratory. Normal mitosis characterised by a fixity in chromosome number occurs only under optimal conditions of aeration and nutrition. Samples examined from agar slants, giant colonies and fermenting cultures show a bewildering array of nuclear complexity. It is yet to be realised that the cytological behaviour of an yeast strain is conditioned by the environment. Few, if any, have searched for normal mitosis under standardized conditions. Owing to the above reasons, an analysis of the earlier literature on yeast cytology is not very illuminating. Normal mitosis in yeast, like endopolyploidy in higher animals and plants, has been discovered only recently.

b. Criteria for Evaluation.

The very use of the terms endo-mitosis, endo-prophase, endo-metaphase etc. indicates clearly that mitosis is the standard for the evaluation of other cytological pictures, though as White (1951) remarks, the

use of such terms is rather unfortunate since the resemblance is only suggestive. Should we not therefore evaluate the changes that occur in cells in active fermentation as well as those growing on agar slants or as giant colonies using mitosis of the particular yeast strain as the standard? In the accepted definition of chromosomes (DARLINGTON, 1937), the emphasis is on anaphase separation. That chromosomes are Feulgen positive is a later discovery.

When as described in this paper, an ascending number of Feulgen-positive bodies are observed in the cells, one can evaluate whether they are chromosomes or not by tracing stage by stage, the increase in complexity from the minimum number present in normal mitotically dividing cells. The different sizes of these structures introduced a new factor. To differentiate simple from compound chromosomes, recourse had to be had to a comparison of the sizes with mitotic chromosomes as well as the other chromatin grains seen in the same cell.

With the increase in chromosome complexity, there is also a corresponding irregularity in anaphase separation during budding in endopolyploid cells. At this stage one has to rely entirely on the positive reaction to the Feulgen stain. It is well known that during endomitosis there is no spindle, no metaphase condensation and no active anaphase movement of chromosomes. Endomitosis itself is not a universal phenomenon in higher animals (FANKHAUSER and HUMPHREY, 1952). Such cells further do not proliferate.

The ability of endopolyploid yeast cells to produce buds complicates issues. When they do divide, the chromosomes show no regular anaphase segregation. HUSKINS reports that when somatic reduction is induced by sodium nucleate treatment, spindle formation and kinomere orientation on it are abnormal and the general appearance of the first reductional division is that of a cell squashed in preparation (HUSKINS, 1948b). The suspicion is engendered that it is these chromosomes in endopolyploid cells showing no orientation or arrangement that have been identified by the earlier workers as volutin or metachromatin.

c. Terminology.

The production of polyploids from callus grafts led WINKLER to conclude that it is only necessary to induce differentiated cells to divide in order to obtain plants with higher chromosome numbers. The prevalence of the opinion that no hard and fast distinction exists between polyploidy and endopolyploidy would be evident from the following comments of HUSKINS (1947).

"It is almost certain that some polyploid plants have been and can be derived from endopolyploid cells and their chromosomes are known to be genetically active chromosomes, i. e. gene strings" (p. 430). He further comments: "While the regu-

larity of certain degrees of polyploidy in some tissues does readily suggest a direct relationship with cellular differentiation, reflection on the usual lack, or rarity of any striking qualitative difference between diploid and autopolyploid organisms, renders any such idea highly speculative" (p. 421).

Endopolyploid yeast cells possessing more than sixteen chromosomes are of common occurrence. At least some of them do proliferate. If the assumption that there is no special difference between polyploid and endopolyploid cells is correct, then it should be possible to isolate an ascending series of polyploid types from proliferating endopolyploid cells of varying chromosome complexity. However, repeated attempts in this direction have met with failure. The only stable polyploid type that could be isolated was the tetraploid.

The fact that the occurrence of spontaneous but rare tetraploid cells could be observed in cultures grown under a variety of physiological conditions including one of aerobiosis clearly indicates that this phenomenon has no relation to endopolyploidy. Further when colchicine or camphor was incorporated into a culture in active fermentation composed of endopolyploid cells, no immediate effect could be observed, nor could an ascending series of polyploid types be recovered. Only tetraploids were produced and even these appeared only after continuous exposure for more than a week (Subramaniam and Sreepathi Rao, 1952).

Comparative investigations on the control diploid yeast and the autotetraploid produced artificially from it, showed that the chromosomal doubling has effected a marked acceleration in the rate of fermentation (Mitra, 1952). Cytological studies proved that during fermentation, cells of both the diploid and the autotetraploid become endopolyploid. These results were interpreted by Mitra and Subramaniam (1949) as indicating that both these strains had to become endopolyploid during fermentation. The accelerated rate of fermentation in the case of the autotetraploid was attributed to the fact that the same degree of endopolyploidy would be reached much earlier by this strain as compared to the diploid.

From the points raised above it would be apparent that there is little justification for using the terms polyploidy and endopolyploidy as though they are synonymous. Endopolyploidy appears to be an adaptation to meet particular environmental conditions. In view of the fact that both the diploid and the tetraploid yeasts become endopolyploid during fermentation, Subramaniam considered as far back as 1947 that the terms polyploidy and endopolyploidy should be clearly distinguished from each other.

In the context of Huskins' comments, that the terms endopolyploidy, polysomaty and polyteny have not always been used with discrimination, it becomes necessary to justify the adoption of the term endopolyploidy to describe the phenomena observed in yeast cells from fermenting cul-

tures, agar slants and giant colonies. The first and foremost reason is that these phenomena bear comparison with those accompanying cellular differentiation in higher animals and plants and which have themselves been brought under the category of endopolyploidy.

Though the occurrence of endopolyploidy in higher plants and animals is now recognised as a general phenomenon, the actual steps by which such nuclear complexity is attained show wide variation. Endomitosis i. e. reproduction of the chromosomes inside the nucleus bounded by the intact nuclear membrane has been observed only in a few cases. In others no orderly stages of chromosome duplication could be observed (Witkus, 1945). In fact the highly endopolyploid nature of some nuclei have been inferred on the basis of indirect evidence as for instance their relative sizes or the number of heterochromatic bodies inside the nucleus (Geitler, 1937).

In a few restricted cases in plants it has been possible to obtain confirmation by stimulating such cells to divide through the use of plant hormones (Huskins and Steinitz, 1948a, b). It is thus apparent that the nuclear phenomena identified as characteristic of endopolyploid cells in higher organisms bear only a general similarity. It is in view of this that the adoption of this term to describe what has been observed in yeast cells appears justifiable. However, this choice has not been made without reservation. For one thing, unlike in the typical endopolyploid cells where chromosome reproduction is by endomitosis, in the present case chromosome reproduction is in the entire absence of a nuclear membrane. In fact during certain stages of chromosome reproduction in endopolyploid yeast cells these bodies lie scattered in the cytoplasm.

Actually the behaviour of chromosomes in cells obtained from giant colonies is rather reminiscent of the conditions described as "polysomaty". The term "polysomaty" however, does not give an indication as to the mode of origin of such a condition. Further it is likely to be confused with polyploidy. The use of the term endopolyploidy was therefore considered more appropriate.

d. Chromosome Reproduction.

The lack of synchronisation in the reproduction of chromosomes leading at times to the production of cells with odd number of chromosomes may at first sight appear intriguing. Even during normal mitosis the post anaphase movements of chromosomes follow no single pattern. Supernumerary reproduction of one of the two chromosomes of the control diploid strain, leading to the production of five instead of four daughter chromosomes in early anaphase has been observed in at least two instances (Duraiswami, Sreepathi Rao and Subramaniam, 1953). Very recently evidence has also been adduced (Royan, 1953) to show

that the separation of the metaphase chromosomes to give rise to daughter chromosomes of anaphase lacks in strict synchronisation.

Huskins and Steinitz remark: "In endomitosis the division of the multi-stranded 'polytene' chromosomes into separate chromosomes does not occur synchronously and suddenly in all of them as it does at anaphase of mitosis. The region of the kinomere is the last, instead of the first, to undergo permanent separation. Instead of abrupt doublings of the chromosome number as in mitosis, there is therefore a gradual change from diploidy to tetraploidy, from tetraploidy to octoploidy and so on. If this occurs during the energic stage also, as indirect evidence indicates, the gradualness of the change will be most evident for the heterochromatic bodies" (1948a, p. 42).

What happens during chromosomal reproduction in endopolyploid yeast cells appears therefore to be nothing exceptional. On this basis the comparatively bigger size of certain of the chromosomes in some cells would be intelligible. Even in the case of higher organisms it would be apparent from a careful analysis of the published literature, that the assumption that the complex nuclear structure in endopolyploid cells is the result of synchronous reproduction of all the chromosomes, is unwarranted (Painter and Reindorp, 1939; Schultz, 1952).

In fact Huskins reports the occurrence of three stranded chromatids, pentaploid and hexaploid mitoses (1947, p. 406) and even haploid cells (1948a, p. 311) in diploid plants. White (1951) in discussing the above report of Huskins, considers that the occasional hexaploid and pentaploid nuclei could not have arisen by endomitosis and suggests that they might have originated by fusion of cells. Proof has yet to be adduced that when chromosomes become polytene there is synchronous division of the homologues.

e. Somatic Synapsis.

Considering that chromosome reproduction is not synchronous, synapsis of the chromosomes during the stages leading to and resulting in the reconstitution of the nucleus is surprisingly regular. Synapsis of chromosomes during the telophase of mitosis was described and illustrated by Duraiswami (1953) and critical evidence for the same was presented by Royan (1953) using the inequality in size of the two chromosomes in a riboflavin excreting mutant top yeast. Photomicrographic evidence was presented for the fusion of the two unequal chromosomes at telophase and their separation during the prophase. The same phenomenon involving a larger number of chromosomes is illustrated in this paper. The attraction between the chromosomes preceding fusion could be separated into two distinct categories. The primary attraction seems to be between pairs of chromosomes and the subsidiary one between such pairs or groups of paired chromosomes (photos 12, 13, 14, 19, 20 and 21; Figs. 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24 and 25). This is reminiscent of the condition described by Grell (1946) in the multiple complex cells of *Culex*. The final result is a

regular reconstituted nucleus which loses the affinity for the Feulgen stain on lapsing into the resting condition. There is no evidence for persisting heterochromatic knobs in resting nuclei.

f. Budding and Somatic Reduction:

In contrast to the differentiated cells of plants and animals which are incapable of any division, endopolyploid yeast cells often show budding. In such cases, two very characteristic types of distribution of the chromosome complement between the mother cell and the bud have been observed to occur. The more common mode of distribution effects a separation into two arbitrary groups of the multiple number of chromosomes in the mother cell.

The alternative method appears to be unique in that endopolyploid nuclei of varying chromosomal complexity pass on to the bud only the normal complement, namely two chromosomes. This phenomenon described as "somatic reduction" (Prahlada Rao and Subramaniam, 1952) appears to be widespread and seems to be characteristic of endopolyploid yeast cells. In an earlier contribution Subramaniam (1948b) reported the occurrence of a very small percentage of normal, mitotically dividing cells in fermenting cultures of the diploid. At that time he suggested that these may be highly resistant cells persisting in an unfavourable environment. The results presented here invalidate such a concept. They are obviously the products of somatic reduction undergone by the endopolyploid cells. From the additional photomicrographic evidence presented in this paper, one has to presume that while on the one hand the phenomenon of endopolyploidy serves as a mechanism ensuring survival of the organism under unfavourable environments, somatic reduction enables it to return to the vegetative phase and then proliferate rapidly when aerobic conditions are restored once more. However, should the environment continue to be unfavourable these cells would in their turn become endopolyploid.

Summary.

1. The occurrence of endopolyploidy in yeasts posed several problems; the most important being the cytological changes that accompany a shift from aero- to anaero-biosis and vice versa and whether these are capable of being correlated with the cytological changes occurring during tissue differentiation in higher organisms.

2. Cytological investigations of cells from 2-day old giant colonies reveal an ascending grade of chromosome complexity. Photomicrographs of cells from smears stained by the Feulgen technique are presented.

3. The absence of any synchronization in the reproduction of chromosomes of even the same complement leads to the production of cells with odd numbers of Feulgen positive bodies of varying sizes.

4. The stages leading to the telophasic reconstitution are remarkably regular. There appears to be a primary attraction between pairs of chromosomes and a secondary one between such pairs or groups of pairs. There is somatic synapsis.

5. Amitosis-like pictures observed represent in reality transitory stages of reconstitution of an endopolyploid nucleus. The occurrence of telophasic nuclei of different sizes suggests that nuclei revert to the resting condition at the end of each doubling of the chromosome complement present in a cell.

6. Endopolyploid cells are capable of budding. Confirmation of the peculiar type of somatic reduction reported earlier is presented.

7. The need for using normal mitosis as a 'standard' to evaluate the changes that occur during endopolyploidy is stressed.

8. The use of the term "endopolyploidy" to include the phenomena reported is discussed. Somatic reduction appears to be an essential adaptation for survival.

References.

. Berger, C. A.: Contributions to Embryology. Carnegie Inst. Wash. Publ. No. **167**, 209 (1938). — Brandt, K. M.: Protoplasma (Berl.) **36**, 77 (1941). — Darlington, C. D.: Recent Advances in Cytology. London. J. & A. Churchill. 1937. — Duraiswami, S.: Cellule **55**, 381 (1953). — Duraiswami, S., and M. K. Subramaniam: Experientia **7**, 422 (1951). — Duraiswami, S., S. K. Sreepathi Rao and M. K. Subramaniam: Experientia **9**, 293 (1953). — Fankhauser, G., and R. R. Humphrey: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **38**, 1073 (1952). — Geitler, L.: Z. Zellforschg. **26**, 64 (1937). — Grell, M.: Genetics **31**, 60 (1946). — Guilliermond, A.: The Yeasts. New York. John Wiley & Sons. 1920. — Huskins, C. L.: Amer. Naturalist **81**, 401 (1947). — J. Hered. **39**, 311 (1948a). — Nature (Lond.) **161**, 80 (1948b). — Internat. Rev. Cytology. **1**, Academic Press Inc. New York. 8, 1952. — Huskins, C. L., and L. M. Steinitz: J. Hered. **39**, 35 (1948a); **39**, 67 (1948b). — Lindegren, C. C.: The Yeast Cell. Its Genetics and Cytology. Educational Publishers. Inc. St. Louis. Mo. 1949; Symposia Soc. f. Exper. Biol. **6**, 277 (1952). — Lorz, A. P.: Bot. Review **13**, 597 (1947). — Mirsky, A. E.: Genetics in the 20th Century. New York. Macmillan & Co. 1951. — Mitra, K. K.: Biochim. et Biophysica Acta **8**, 615 (1952). — Mitra, K. K., and M. K. Subramaniam: Cellule **53**, 7 (1949). — Nagel, L.: Bot. Review **14**, 174 (1948). — Painter, T. S., and E. Reindorp: Chromosoma **1**, 276 (1939). — Prahlada Rao, L. S., and M. K. Subramaniam: Arch. f. Mikrobiol. **17**, 160 (1952). — Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B. **37**, 72 (1953). — Royan, S.: Arch. f. Mikrobiol. **19**, 267 (1953). — Schultz, J.: Exper. Cell. Res., Suppl. **2**, 17 (1952). — Subramaniam, M. K.: Proc. Nat. Inst. Sci. India **12**, 143 (1946). — Current Sci. **16**, 157 (1947). — Proc. Nat. Inst. Sci. India **14**, 315 (1948a); **14**, 325 (1948b). — J. Indian Inst. Sci. **34**, 11 (1952). — Subramaniam, M. K., and B. Ranganathan: Current Sci. **14**, 78 (1945). — Subramaniam, M. K., and S. K. Sreepathi Rao: Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B. **35**, 1 (1952). — Subramaniam, M. K., B. Ranganathan and S. N. Krishna Murthy: Cellule **52**, 39 (1948). — Wager, H., and A. Peniston: Ann. of Bot. **23**, 45 (1910). — White, M. J. D.: Animal Cytology and Evolution. Cambridge Univ. Press. 1945. — Cytology and Cell. Physiology. Oxford. Clarendon Press. 1951. — Winge, Ö.: C. R. Trav. Labor. Carlsberg, Sér. physiol. **25**, 85 (1951). — Witkus, E. R.: Amer. J. Bot. **32**, 326 (1945).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 201—220 (1954).

(Aus dem Institut für landw. Bakteriologie und Gärungsbiologie,
Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.)

Untersuchungen über den Wuchsstoffbedarf einiger Kulturweinhefen.

Von
T. Wikén, H. Somm und F. Sulzer.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 2. Dezember 1953.)

Über den Wuchsstoffbedarf der *Kulturhefen* (Brennerei-, Bier-, Wein- und Bäckerhefen) und der sogenannten *wilden Hefen* liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Auf Grund der Ergebnisse dieser Untersuchungen wurde die Hypothese aufgestellt, daß die wilden Hefen fähig sind, eine synthetische Nährlösung zu assimilieren, welche nur Zucker und anorganische Salze enthält, während die Kulturhefen, welche seit Jahren auf den im Laboratorium bereiteten Nährböden weitergezüchtet wurden, dieses Vermögen verloren haben und nunmehr einen ausgeprägten auxoheterotrophen Charakter aufweisen (siehe Fries, 1938, S. 1; Schopfer, 1949, S. 126; Rippel-Baldes, 1952, S. 129).

Kürzlich konnte nun einwandfrei gezeigt werden, daß diese Hypothese eine unstatthafte Verallgemeinerung enthält, indem die schweizerischen Kulturweinhefen „*Fendant*", „*Herrliberg*" und „*Salenegg*" imstande sind, in ganz kurzer Zeit ein wuchsstofffreies synthetisches Substrat zu assimilieren, welches Ammoniumsulfat oder vitaminfreies Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle enthält (Wikén u. Richard, 1951a und b, 1952a). Dabei findet die Vermehrung längs einer normalen, rasch ansteigenden, schwach S-förmigen Wachstumskurve statt. Die Vermehrungsgeschwindigkeit ist auf dem Ammoniumsulfat praktisch gleich groß wie auf dem Aminosäuregemisch. Ferner wird in beiden Fällen approximativ die gleiche maximale Ausbeute an Zellen erreicht. Im Falle der „*Fendant*"-Hefe ist in Gegenwart von (+)-Biotin oder meso-Inosit eine kleine, aber deutliche günstige Wirkung bemerkbar. Der fördernde Einfluß der Kombination beider Wuchsstoffe ist gleich groß oder ein wenig größer als die Wirkung des meso-Inosits allein. Bei den Rassen „*Herrliberg*" und „*Salenegg*" übt (+)-Biotin weder auf die Geschwindigkeit der Zellvermehrung noch auf die Höchstausbeute an Zellen einen Einfluß aus. Dagegen bewirkt meso-Inosit eine bedeutende Stimulierung des Wachstums dieser beiden Heferassen. Die fördernde Wirkung des meso-Inosits kann nicht durch Zusatz von (+)-Biotin gesteigert werden. Adermin, Aneurin und (+)-Pantothensäure, einzeln oder in verschiedenen Kombinationen zugesetzt, erwiesen sich bei den erwähnten drei Hefen als völlig inaktiv. Hier sei nur noch erwähnt, daß die Kulturweinhefen „*Fendant*", „*Herrliberg*" und „*Salenegg*" trotz ihrer ausgeprägten Auxo-Autotrophie äußerst empfindlich auf sehr kleine Mengen des (+)-Biotins bzw. meso-Inosits reagieren, indem bereits 0,0025—0,025 γ des ersten und 0,25—2,5 mg des letzten Vitamins je 1000 ml Substrat aktiv sind.

Die Ansicht, daß nur wilde Hefen imstande seien, in angemessener Zeit eine wuchsstofffreie synthetische Nährlösung zu assimilieren, den Kulturhefen aber dieses Vermögen fehle, hat somit keine allgemeine Gültigkeit. Die im hiesigen Institut durchgeführten Untersuchungen (Wikén u. Richard, 1951 a und b, 1952 a und b, Fiechter, 1953) deuten vielmehr darauf hin, daß die Gruppe der Kulturweinhefen bezüglich des Bedarfs an Wuchsstoffen durch eine sehr große Heterogenität gekennzeichnet ist, wobei die Zahl der Rassen, welche wie „*Fendant*", „*Herriberg*" und „*Salenegg*" auxo-autotroph sind, sicher nicht gering ist.

Die von Wikén u. Richard (1951b und 1952b) untersuchte Kulturweinhefe „*Dézaley*" weist eine komplizierte Auxo-Heterotrophie auf, indem ihre Zellen erst durch eine Kombination der drei Wuchsstoffe (+)-Biotin, meso-Inosit und (+)-Pantothensäure zur maximalen Vermehrung gebracht werden können, während



a *b* *c*

Abb. 1. Riesenkolonien der Heferassen „*Maienfeld I a*" (*a*), „*Spanien II*" (*b*) und „*Ungarn I*" (*c*) auf Würzegelatine nach Stelling-Dekker (1931). 4 Wochen alte Kulturen. $^9/_{10}$ natürlicher Größe.

die von Fiechter (1953) beschriebene Rasse „*Polymorphus II*" zum normalen Wachstum nur einen Wuchsstoff, und zwar (+)-Biotin nötig hat. Von der ersten Hefe wird ferner eine ammoniumsulfathaltige und von der letzten eine caseinhydrolysathaltige Nährlösung ohne irgendeinen Zusatz von Vitaminen langsam assimiliert.

Die nachstehenden Ausführungen stellen einen weiteren Beitrag zur Frage nach der Wirkung wasserlöslicher Vitamine auf die Vermehrung der Kulturweinhefen in synthetischen Substraten dar. Als Versuchsobjekte dienten die Rassen „*Maienfeld Ia*", „*Spanien II*" und „*Ungarn I*" von der Eidg. Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil (siehe Lüthi, 1947). Das Aussehen der Riesenkolonien der drei Heferassen auf Würzegelatine nach Stelling-Dekker (1931, S. 30 bis 31; auf 10° Balling verdünnte Würze; 16% Gelatine) geht aus Abb. 1 hervor.

Methodik.

Das Impfmaterial stammte in sämtlichen Versuchen aus 2 Tage alten Kulturen der betreffenden Heferassen in der von Wikén u. Richard (1951a) als A bezeichneten Nährlösung. Diese hat die folgende Zusammensetzung (vgl. Modess, 1941 S. 16): Nährlösung A: Glucose 20,0 g; Malzextrakt „Biomalz" 5,0 g; NH_4Cl 0,5 g; KH_2PO_4 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g; $FeCl_3$-Lösung, 1 mg $FeCl_3$/ml 1,0 ml; dest. Wasser ad 1000,0 ml.

Als Substrate in den Wachstumsversuchen dienten die ebenfalls von Wikén u. Richard (1951a) vorgeschlagenen Nährlösungen B^1 und C. Diese sind von der folgenden Zusammensetzung (vgl. Williams u. Mitarb., 1941 S. 86 bzw. Atkin u. Mitarb., 1949 S. 98): Nährlösung B^1: Glucose 50,0 g; $(NH_4)_2SO_4$ 6,0 g; KH_2PO_4 2,0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 g; $CaCl_2$ 0,25 g; H_3BO_3-Lösung, 1 mg H_3BO_3/ml 1,0 ml; $ZnSO_4$-Lösung, 1 mg $ZnSO_4$/ml 1,0 ml; $MnCl_2$-Lösung, 1 mg $MnCl_2$/ml 1,0 ml; Tl_2SO_4-Lösung, 1 mg Tl_2SO_4/ml 1,0 ml; $FeCl_3$-Lösung, 0,5 mg $FeCl_3$/ml 1,0 ml; $CuSO_4$-Lösung, 0,1 mg $CuSO_4$/ml 1,0 ml; KJ-Lösung, 0,1 mg KJ/ml 1,0 ml; dest. Wasser ad 1000,0 ml. — Nährlösung C: Glucose 50,0 g; KH_2PO_4 0,55 g; KCl 0,425 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,125 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,125 g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 2,5 mg; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2,5 mg; Kaliumcitrat-Puffer, 0,4 m, $p_H = 4{,}8$—5,0 50,0 ml; Caseinhydrolysat, vitaminfrei, 10%, $p_H = 4{,}8$—5,0 40,0 ml; dest. Wasser ad 1000,0 ml.

Die Vitaminkonzentrationen der Kultursubstrate B^1 und C waren wie folgt: (+)-Biotin 25 γ/1000 ml; D(+)-Pantothensäure (als Ca-Salz) 2,5 mg/1000 ml; meso-Inosit 25 mg/1000 ml; Adermin 0,5 mg/1000 ml; Aneurin 0,5 mg/1000 ml.

Bezüglich der Einzelheiten der Herstellung der erwähnten Substrate, der Impfung und Bebrütung der Kulturen sowie der Messung des Wachstums verweisen wir auf die Arbeit von Wikén u. Richard (1951a). Hier sei nur erwähnt, daß sämtliche Versuche in Reagenzgläsern mit je 8 ml Nährlösung bei 20°C durchgeführt wurden, wobei die mit gewaschenen Hefezellen geimpften Kulturen einmal täglich gründlich geschüttelt wurden. Als Maß des Wachstums wurde das Absorptionsvermögen der Kulturen für Licht der Wellenlänge 660 mμ verwendet. Die Lichtabsorption der zwecks Aufschwemmung der Hefe kräftig geschüttelten Kulturen wurde mit Hilfe eines Beckman-Spektrophotometers in Corex-Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm gemessen, wobei die Spaltweite 0,06 mm betrug und das unbeimpfte Substrat als Vergleichslösung (Durchlässigkeit = 100%) diente.

In den Tab. 1—12 sind die erwähnten Durchlässigkeitswerte (%) als Maß des Wachstums angeführt, wobei sämtliche Werte Durchschnitte aus 5 parallelen Kulturen darstellen.

Verlauf der Versuche.

Heferasse „Maienfeld Ia".

Im ersten Versuch, dessen Ergebnisse in Tab. 1 (S. 204) aufgeführt sind, wurden die Wuchsstoffe einzeln zugesetzt. Es ist ersichtlich, daß in Nährlösung C (Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle) sowohl Biotin als auch Pantothensäure einen fördernden Einfluß auf die Vermehrung der Hefe ausüben, während in Substrat B^1 (Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle) nur Biotin wirksam ist. Inosit, Adermin und Aneurin sind praktisch inaktiv in beiden Substraten.

Im zweiten Versuch wurde die Wirkung verschiedener Kombinationen von Biotin, Pantothensäure und Inosit geprüft, wobei zum Vergleich teils Kulturen ohne irgendeinen Vitaminzusatz, teils solche mit Zusatz der einzelnen Vitamine angesetzt wurden. Aus Tab. 2 (S. 205) geht hervor, daß die Wuchsstoffwirkung des Biotins in Nährlösung B^1 durch Inosit und vor allem durch Pantothensäure und die Kombination dieser beiden Wuchsstoffe erheblich gesteigert wird. Die Gemische Biotin +

Pantothensäure + Inosit und Biotin + Pantothensäure ermöglichen in der Tat eine sehr rasche Vermehrung, welche praktisch ohne Induktionsperiode einsetzt.

In Substrat C ist die Kombination von Biotin und Pantothensäure wesentlich aktiver als die einzelnen Vitamine und ermöglicht eine Vermehrung der Hefezellen, welche praktisch von der gleichen Geschwindig-

Tabelle 1. *Heferasse: „Maienfeld Ia“.*
Impfkultur: Nährlösung A, 48 Std alt. — Impfung: 26. 1. 53. — 5 Parallelen.

Zeit Std	Kein Wuchsstoffzusatz	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml	Adermin 0,5 mg/1000 ml	Aneurin 0,5 mg/1000 ml	Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml	meso-Inosit 25 mg/1000 ml
			Nährlösung B^1			
24	98,8	99,0	98,8	99,0	98,5	99,0
48	98,5	98,4	98,0	98,2	97,4	98,1
72	95,7	95,9	95,2	97,1	96,1	95,0
96	89,6	85,6	87,8	88,5	90,1	84,4
120	74,9	63,6	76,7	75,4	71,4	72,6
168	61,4	25,7	59,3	56,5	58,3	55,6
192	51,9	17,2	50,3	47,3	48,4	44,8
216	45,0	11,6	45,0	43,0	43,0	43,1
			Nährlösung C			
24	98,1	98,0	99,1	98,5	95,9	97,8
48	97,7	97,2	98,9	98,1	87,2	93,4
72	98,7	98,6	98,6	99,4	80,7	98,5
96	97,1	97,5	98,5	98,1	70,1	97,1
120	97,3	97,2	98,7	97,5	50,1	97,6
168	96,3	92,9	98,2	98,7	49,0	97,4
192	93,9	77,2	99,8	96,9	41,2	95,8
216	94,5	49,1	98,9	96,8	35,1	95,2

keit und Größe ist wie in den Kulturen, welche gleichzeitig Biotin, Pantothensäure und Inosit enthalten. Inosit bewirkt eine deutliche Erhöhung der Wuchsstoffwirkung der Pantothensäure, während es in den mit Biotin versetzten Kulturen in angemessener Zeit keine zusätzliche Wachstumsstimulierung hervorruft.

Mit dem dritten Versuch beabsichtigten wir, den Einfluß des Adermins und Aneurins auf den Wuchsstoffeffekt des Biotins zu untersuchen. Die Ergebnisse, welche in Tab. 3 (S. 206) vorliegen, bestätigen eindeutig, daß Adermin und Aneurin völlig inaktiv sind. Die Kulturen, welche Gemische dieser Vitamine mit Biotin enthalten, zeigen praktisch das gleiche Wachstum wie die Kulturen, welche mit Biotin allein versetzt waren.

Aus den Tab. 1—3 geht ferner hervor, daß die Heferasse „*Maienfeld Ia*“ imstande ist, die wuchsstofffreien Nährlösungen B^1 und C lang-

sam zu assimilieren. Seit den klassischen Untersuchungen von Copping (1929) ist es nun bekannt, daß die Vermehrung der Hefen häufig sehr stark von der Größe der zur Impfung verwendeten Zellmenge abhängig ist, indem Heferassen, welche nach schwacher Impfung in vitaminfreien Substraten kein Wachstum zeigen, nach starker Impfung die gleichen Nährlösungen zu assimilieren vermögen. Auf diese Erscheinung wird ja

Tabelle 2. *Heferasse: „Maienfeld Ia“.*
Impfkultur: Nährlösung A, 48 Std alt. — Impfung: 21. 2. 53. — 5 Parallelen.

Zeit Std	Kein Wuchsstoffzusatz	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml	Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml	meso-Inosit 25 mg/1000 ml	Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml meso-Inosit 25 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml: Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml: meso-Inosit 25 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml: Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml meso-Inosit 25 mg/1000 ml
				Nährlösung B^1				
48	98,7	97,6	98,1	98,5	98,2	79,5	97,4	71,3
72	98,0	94,8	98,5	96,3	98,5	37,5	93,9	26,2
96	97,7	86,2	98,0	97,7	97,8	21,7	84,6	10,1
120	96,0	66,2	98,2	97,8	97,4	14,6	53,2	9,1
144	97,5	38,8	97,3	97,0	96,0	12,4	27,0	10,0
168	98,0	23,0	97,6	97,1	95,9	12,2	14,1	10,6
216	96,6	12,2	95,3	95,3	92,7	13,4	10,5	9,7
240	97,1	10,9	96,0	95,4	94,2	13,4	10,4	9,8
				Nährlösung C				
48	99,8	99,6	99,3	99,9	95,3	98,3	99,8	96,0
72	98,5	98,0	95,9	98,2	73,3	86,2	98,1	59,5
96	98,7	97,1	98,0	98,5	63,8	41,1	98,5	14,3
120	99,0	97,0	78,5	99,0	47,6	14,8	98,4	6,8
144	98,1	89,1	76,5	98,2	38,2	7,6	96,9	6,0
168	96,0	88,1	68,8	98,8	32,1	7,0	86,8	6,4
216	91,5	74,7	60,3	98,5	27,9	7,0	61,8	6,4
240	87,0	63,1	54,5	94,9	24,9	7,0	39,8	6,6

in gewissen zusammenfassenden Arbeiten (siehe z. B. Schopfer, 1949, S. 125) die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der einerseits von Pasteur, anderseits von Liebig angestellten Wachstumsversuche mit Hefen zurückgeführt. Um die Bedeutung der Impfmenge für das Wachstum der Hefe *„Maienfeld Ia“* zu beleuchten, wurden ein vierter Versuch in Nährlösung B^1 und ein fünfter in Nährlösung C angesetzt. Die zur Impfung verwendeten Zellmengen verhielten sich dabei wie 1 zu 10. Dies entsprach einer Durchlässigkeit der frisch geimpften Kulturen von 99,2—99,4 bzw. 98,3—98,7%. Aus den in Tab. 4 bzw. 5 (S. 207) aufgeführten Ergebnissen ist ersichtlich, daß die Vermehrungsgeschwindigkeit der Hefe sowohl in den wuchsstofffreien, als auch in den wuchs-

stoffhaltigen Substraten zwar von der Größe der Impfmenge abhängig ist, dieser Umstand aber für die Beurteilung der Wirkung der einzelnen Vitamine belanglos ist. Bei schwacher wie bei starker Impfung übt Biotin in beiden Substraten einen fördernden Einfluß auf die Zellvermehrung aus, während Pantothensäure nur in Nährlösung C wirksam ist und Adermin sowie Aneurin und Inosit durchgehend inaktiv sind.

Tabelle 3. *Heferasse: „Maienfeld Ia".*
Impfkultur: Nährlösung A, 48 Std alt. — Impfung: 28. 2. 53. — 5 Parallelen.

Zeit Std	Kein Wuchsstoffzusatz	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml	Adermin 0,5 mg/1000 ml	Aneurin 0,5 mg/1000 ml	Adermin 0,5 mg/1000 ml Aneurin 0,5 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml Adermin 0,5 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml Aneurin 0,5 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml Adermin 0,5 mg/1000 ml Aneurin 0,5 mg/1000 ml
				Nährlösung B[1]				
48	98,6	97,0	98,4	98,3	98,7	96,5	98,4	97,8
72	99,1	93,7	98,6	99,2	99,3	93,1	96,1	95,8
96	98,6	82,4	98,5	98,7	98,6	82,8	78,0	79,9
120	97,5	57,9	97,0	98,9	99,1	63,4	57,4	54,8
144	97,4	35,3	96,7	98,6	98,7	41,2	35,3	31.9
168	96,9	20,5	95,9	98,1	98,2	22,3	18,0	18,0
216	94,5	12,1	93,2	96,8	96,0	13,3	12,6	12,6
240	94,2	12,2	94.0	95,7	95,6	12,0	12,4	13,2
				Nährlösung C				
48	98,2	99,1	95,6	96,4	97,0	96,9	97,9	97,8
72	99,5	98,1	96,9	97,1	98,7	98,1	98,5	98,6
96	99,5	97,8	96,4	97,1	98,2	98,6	97,9	98,6
120	97,9	86,3	94,6	95,4	96,8	96,7	88,9	97,6
144	97,9	66,9	98,5	94,4	95,2	88,1	86,8	86,9
168	97,6	22,6	94,0	96,9	94,7	34,9	49,4	50,0
216	94,0	15,9	93,8	94,8	95,6	7,7	20,4	12,1
240	92,8	16,6	93,1	93,9	91,8	6,8	8,9	8,7

Der Wuchsstoffbedarf der Kulturweinhefe *„Maienfeld Ia"* erinnert stark an denjenigen der von Wikén u. Richard (1951b und 1952b) untersuchten Rasse *„Dézaley"*. Beispielsweise wird in beiden Fällen maximales Wachstum erst nach Zusatz einer Kombination der drei Vitamine Biotin, Inosit und Pantothensäure ermöglicht. Ferner erweisen sich Adermin und Aneurin, einzeln oder gleichzeitig zugesetzt, als völlig inaktiv. Anderseits bestehen in den Wuchsstoffansprüchen der beiden Hefen große Unterschiede. In den Kulturen mit Inosit allein tritt bei der Rasse *„Maienfeld Ia"* praktisch keine Förderung der Zellvermehrung auf, während bei der *„Dézaley"*-Hefe eine deutliche Stimulierung des Wachstums feststellbar ist, usw.

Tabelle 4. *Heferasse: „Maienfeld Ia“.*
Impfkultur: Nährlösung A, 48 Std alt. — Kultursubstrat: Nährlösung B[1]. — Impfung: 10. 4. 53. — 5 Parallelen.

Zeit Std	Kein Wuchsstoff-zusatz	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml	Adermin 0,5 mg/ 1000 ml	Aneurin 0,5 mg/ 1000 ml	Pantothen-säure 2,5 mg/ 1000 ml	meso-Inosit 25 mg/ 1000 ml
			Schwache Impfung			
72	98,7	98,5	98,8	98,9	99,0	98,8
96	98,9	97,7	98,6	98,2	98,1	97,5
120	97,7	91,4	97,9	98,0	97,3	97,4
144	98,4	85,9	98,1	98,7	98,1	97,5
168	97,3	78,5	97,0	97,5	97,2	96,8
192	94,7	73,0	94,7	95,9	94,7	93,5
240	95,7	61,1	94,8	96,1	96,2	93,8
268	92,3	46,6	92,9	93,4	91,8	—
			Starke Impfung			
72	96,8	89,9	96,2	97,4	96,2	96,6
96	96,2	83,9	95,4	97,2	95,0	94,9
120	95,3	77,2	94,3	96,9	93,9	94,7
144	94,2	73,5	93,0	95,8	93,3	93,4
168	91,6	65,6	90,9	95,3	91,2	91,4
192	89,7	56,7	89,1	94,7	89,4	90,1
240	88,6	41,0	88,6	94,1	86,6	87,4
268	86,6	36,9	86,1	90,3	85,7	82,4

Tabelle 5. *Heferasse: „Maienfeld Ia“.*
Impfkultur: Nährlösung A, 48 Std alt. — Kultursubstrat: Nährlösung C. — Impfung: 11. 4. 53. — 5 Parallelen.

			Schwache Impfung			
48	97,8	97,9	98,2	98,5	95,7	97,1
72	97,5	96,8	97,4	97,8	88,9	95,8
96	97,2	97,2	98,5	98,0	77,2	94,2
120	96,8	94,8	96,4	97,0	73,7	94,2
144	93,8	88,6	96,6	94,1	64,6	93,1
168	94,1	71,2	94,4	93,0	61,2	92,4
216	90,6	13,2	91,1	85,4	52,3	90,6
240	86,9	6,1	86,5	87,3	41,1	86,6
			Starke Impfung			
48	85,7	84,8	85,4	86,7	80,9	79,7
72	81,2	82,6	78,8	81,5	70,8	81,8
96	76,4	76,1	77,9	77,2	64,4	76,6
120	71,0	51,8	71,8	69,6	58,3	68,4
144	65,9	21,2	68,2	65,7	47,0	57,7
168	64,6	12,8	66,0	64,1	44,4	56,8
216	55,7	6,6	57,3	54,5	34,9	52,2
240	47,5	6,1	51,1	45,5	27,0	52,8

Heferasse „Spanien II".

Die Ergebnisse des ersten Versuchs mit der Kulturweinhefe „*Spanien II*" liegen in Tab. 6 vor. Es ist ersichtlich, daß die Wuchsstoffe Biotin, Adermin, Aneurin, Pantothensäure und Inosit, einzeln zugesetzt, sowohl im ammoniumsulfathaltigen (B^1) als auch im caseinhydrolysathaltigen (C) Substrat unwirksam sind oder (Adermin und Aneurin) eine

Tabelle 6. *Heferasse: „Spanien II".*
Impfkultur: Nährlösung A, 48 Std alt. — Impfung: 7. 2. 53. — 5 Parallelen.

Zeit Std	Kein Wuchsstoffzusatz	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml	Adermin 0,5 mg/ 1000 ml	Aneurin 0,5 mg/ 1000 ml	Pantothensäure 2,5mg/ 1000 ml	meso-Inosit 25 mg/ 1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml Pantothensäure 2,5mg/ 1000 ml
				Nährlösung B^1			
48	98,0	97,3	97,3	97,4	97,5	97,5	97,4
72	97,8	97,0	97,4	97,5	97,4	97,5	96,2
96	97,4	97,2	96,6	96,7	97,2	95,9	96,1
120	97,5	97,6	95,5	96,0	97,5	96,5	93,5
144	97,0	95,0	94,0	93,3	96,1	95,2	86,8
168	96,3	94,4	92,4	93,3	96,3	92,6	79,2
216	92,3	91,4	89,8	90,6	94,2	92,3	47,9
240	91,4	90,6	88,4	89,9	89,2	90,1	30,5
				Nährlösung C			
48	97,8	97,4	97,0	96,6	97,3	97,8	97,3
72	97,8	97,4	97,0	96,3	97,4	97,7	97,2
96	97,6	97,3	97,2	95,8	97,3	97,6	96,9
120	98,3	98,0	97,8	96,6	98,0	98,2	97,9
144	98,1	98,1	97,0	95,7	97,7	97,8	97,0
168	97,8	97,8	97,1	96,5	97,7	97,5	97,3
216	96,6	97,2	96,4	95,2	96,1	96,4	96,5
240	96,9	97,1	95,0	94,5	96,5	95,6	96,5

kleine günstige Wirkung haben, während das Gemisch von Biotin und Pantothensäure in der ersten Nährlösung einen mittelmäßigen fördernden Einfluß auf die Vermehrung der Hefe ausübt.

Aus den Ergebnissen des zweiten Versuchs, die in Tab. 7 (S. 209) aufgeführt sind, geht hervor, daß die Rasse „*Spanien II*" gleich wie „*Dézaley*" (Wikén u. Richard, 1951 b und 1952 b) und „*Maienfeld I a*" erst durch ein Gemisch der drei Vitamine Biotin, Pantothensäure und Inosit zur maximalen Vermehrung gebracht werden kann. Die in Tab. 7 angeführten Daten bestätigen, daß die Kombination von Biotin und Pantothensäure in Nährlösung B^1 eine wachstumsstimulierende Wirkung ausübt, und zeigen ferner, daß im erwähnten Substrat auch ein Gemisch von Biotin und Inosit aktiv ist.

Es wurde mit der Hefe „*Spanien II*" ein dritter Versuch durchgeführt, um den Einfluß der Wuchsstoffe Adermin und Aneurin auf das

Wachstum in Kulturen mit und ohne Biotin zu untersuchen. Aus Tab. 8 (S. 210) ergibt sich, daß die Gemische Biotin + Adermin, Biotin + Adermin + Aneurin und Biotin + Aneurin wirksam sind, und zwar sowohl im Ammoniumsulfathaltigen (B^1) als auch im caseinhydrolysathaltigen (C) Substrat. Dabei ist die Aktivität der ersten beiden Kombinationen in Nährlösung B^1 und diejenige der letzten Kombination in Lösung C am

Tabelle 7. *Heferasse: „Spanien II".*
Impfkultur: Nährlösung A, 48 Std alt. — Impfung: 7. 3. 53. — 5 Parallelen.

Zeit Std	Kein Wuchsstoffzusatz	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml	Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml	meso-Inosit 25 mg/1000 ml	Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml meso-Inosit 25 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml: Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml: meso-Inosit 25 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml: Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml meso-Inosit 25 mg/1000 ml
				Nährlösung B^1				
48	99,0	98,5	99,0	98,7	98,3	98,3	98,2	97,7
72	98,1	97,1	98,6	98,1	97,9	95,6	96,2	93,1
96	98,3	97,1	98,3	98,0	97,4	93,2	95,1	84,2
120	98,1	96,3	98,4	97,7	97,2	90,3	92,5	48,9
144	98,7	94,6	98,3	97,8	97,5	80,2	86,0	30,8
168	98,1	94,1	98,3	97,7	97,1	71,7	82,9	28,4
216	98,3	90,7	98,1	97,2	96,6	47,0	33,6	15,8
240	98,5	86,5	97,3	97,1	95,9	27,3	20,6	12,5
				Nährlösung C				
48	98,6	98,8	98,6	98,4	98,8	98,8	98,9	98,3
72	98,3	98,3	98,6	98,1	98,2	98,8	98,7	97,8
96	98,4	98,2	98,1	98,3	97,6	98,2	98,2	97,5
120	97,9	97,8	97,7	98,0	97,3	97,3	97,9	95,9
144	97,6	98,2	97,9	97,9	96,5	97,9	97,5	94,6
168	98,1	98,2	98,0	97,9	95,9	98,1	98,0	93,4
216	97,8	98,0	95,5	96,7	90,9	97,1	97,1	67,6
240	97,5	97,8	94,4	96,8	89,2	97,1	96,9	31,9

größten. Adermin, einzeln zugesetzt, zeigt wie das Gemisch Adermin + Aneurin einen kleinen fördernden Einfluß in beiden Substraten, während Aneurin allein nur in Medium C wirksam ist.

Die erwähnten Ergebnisse wurden, wie aus Tab. 9 (S. 210) hervorgeht, durch die Resultate eines vierten Versuchs durchgehend bestätigt.

Bei der Rasse „*Spanien II*" kann die Kombination Biotin + Pantothensäure + Inosit in Anwesenheit von Ammoniumsulfat oder Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle somit durch das Dreiergemisch Biotin + Adermin + Aneurin ersetzt werden. Auch die Zweierkombinationen Biotin + Adermin und Biotin + Aneurin ermöglichen in beiden Fällen eine Vermehrung der erwähnten Hefe, wobei das erste Gemisch in der

Tabelle 8. *Heferasse: „Spanien II".*
Impfkultur: Nährlösung A, 48 Std alt. — Impfung: 13. 3. 53. — 5 Parallelen.

Zeit Std	Kein Wuchsstoffzusatz	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml	Adermin 0,5 mg/1000 ml	Aneurin 0,5 mg/1000 ml	Adermin 0,5 mg/1000 ml + Aneurin 0,5 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml: Adermin 0,5 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml: Aneurin 0,5 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml: Adermin 0,5 mg/1000 ml + Aneurin 0,5 mg/1000 ml
				Nährlösung B[1]				
60	97,3	96,3	97,5	97,3	97,3	91,3	95,1	87,7
84	96,8	94,8	94,8	96,3	96,3	79,4	93,4	63,1
108	95,9	93,8	91,8	95,3	94,2	61,8	92,1	43,5
132	94,3	91,9	90,7	93,2	89,2	34,3	91,6	25,5
156	91,9	90,5	90,2	91,9	87,5	26,1	90,9	18,3
180	89,6	88,6	87,2	87,6	85,1	17,1	86,6	13,0
228	91,5	84,0	83,9	86,7	84,6	11,3	74,8	11,3
252	87,6	82,3	80,2	84,1	80,7	11,4	68,3	11,3
				Nährlösung C				
60	98,0	97,9	96,8	96,5	95,4	95,7	95,2	96,0
84	97,5	97,1	95,6	95,0	95,7	95,0	93,1	96,0
108	97,4	97,3	94,8	94,3	94,4	95,2	90,5	95,2
132	97,6	97,1	93,3	94,0	94,4	94,9	87,3	95,7
156	97,7	97,4	92,1	93,1	93,7	95,5	70,8	95,8
180	97,2	97,2	91,7	93,7	93,7	94,1	56,0	93,7
228	97,3	97,0	91,7	93,6	94,0	76,8	30,9	62,2
252	96,9	97,6	91,6	93,6	92,8	40,3	26,0	18,5

Tabelle 9. *Heferasse: „Spanien II".*
Impfkultur: Nährlösung A, 48 Std alt. — Impfung: 18. 4. 53. — 5 Parallelen.

				Nährlösung B[1]				
48	98,1	98,1	98,1	98,2	98,0	94,0	96,2	92,0
72	97,5	98,5	96,9	97,8	97,1	86,0	94,3	78,0
96	96,7	97,6	95,9	96,3	95,7	58,7	91,7	50,1
120	96,7	96,6	94,2	95,3	92,9	50,2	91,4	38,6
144	95,9	95,9	93,0	95,0	92,0	28,4	89,2	22,8
168	95,2	95,3	92,5	92,5	90,1	20,5	88,0	14,8
216	94,0	91,8	88,7	93,0	86,3	12,4	78,1	9,7
240	91,3	91,6	89,9	92,3	86,7	10,6	69,9	10,5
				Nährlösung C				
48	98,5	98,2	92,8	95,5	93,9	94,8	95,4	96,1
72	97,9	98,5	90,4	93,8	92,3	94,2	93,3	96,5
96	98,1	97,2	91,9	90,9	92,6	93,4	80,2	95,0
120	98,1	97,8	91,8	91,2	92,0	93,2	71,1	95,9
144	97,3	96,9	91,9	89,4	89,9	89,4	51,8	94,6
168	97,6	98,2	90,8	90,4	91,0	87,5	37,1	92,9
216	97,8	98,2	84,5	89,2	89,0	51,4	32,0	39,1
240	98,2	98,1	82,8	89,7	87,1	29,8	—	25,8

ammoniumsulfathaltigen und das letzte in der caseinhydrolysathaltigen Nährlösung den größten Wuchsstoffeffekt ausübt. Mit den Zweiergemischen Biotin + Pantothensäure und Biotin + Inosit erhält man dagegen nur in Gegenwart des Ammoniumsalzes eine wachstumsfördernde Wirkung.

„*Spanien II*" ist die einzige der von uns bisher untersuchten Kulturweinhefen, bei welcher Adermin und Aneurin, einzeln und gleichzeitig zugesetzt, einen wenn auch kleinen Wuchsstoffeffekt ausüben (vgl. Wikén u. Richard, 1951 a und b, 1952a und b, sowie Fiechter, 1953).

Heferasse „Ungarn I".

Im ersten Versuch mit „*Ungarn I*" wurde die Wirkung der einzelnen Vitamine geprüft. Die Ergebnisse liegen in Tab. 10 vor. Sie zeigen eindeutig, daß nur Biotin eine rasche Assimilation der Substrate B^1 und C durch die Zellen dieser Heferasse ermöglicht. Adermin, Aneurin, Pantothensäure und Inosit sind praktisch unwirksam. Aus Tab. 10 geht ferner hervor, daß die Hefe „*Ungarn I*" das Vermögen besitzt, sich in der caseinhydrolysathaltigen Nährlösung (C) ohne irgendeinen Wuchsstoffzusatz langsam zu vermehren.

Tabelle 10. *Heferasse: „Ungarn I".*
Impfkultur: Nährlösung A, 48 Std alt. — Impfung: 14. 2. 53. — 5 Parallelen.

Zeit Std	Kein Wuchsstoffzusatz	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml	Adermin 0,5 mg/1000 ml	Aneurin 0,5 mg/1000 ml	Pantothensäure 2,5mg/1000 ml	meso-Inosit 25 mg/1000 ml
			Nährlösung B^1			
48	97,8	97,4	98,4	97,9	98,2	98,2
72	98,2	89,3	97,5	98,5	98,2	97,8
96	98,5	64,3	98,2	98,5	98,1	98,1
120	98,1	39,1	97,5	98,1	98,0	97,9
144	98,6	29,7	97,6	98,1	98,2	97,7
168	98,2	22,2	97,4	98,1	97,9	97,3
216	98,0	17,0	97,5	98,3	98,3	96,5
240	97,2	14,9	97,9	97,4	97,3	97,0
264	96,9	15,0	96,5	97,5	96,3	96,9
			Nährlösung C			
48	97,0	94,7	97,4	94,2	93,8	96,3
72	95,0	87,1	96,1	88,9	86,8	91,3
96	92,7	59,5	90,4	89,9	84,0	87,9
120	83,1	23,9	83,7	81,3	75,5	77,8
144	80,1	17,8	76,2	80,5	72,1	74,7
168	73,9	11,0	68,2	76,2	69,0	71,2
216	69,5	8,1	63,0	69,0	61,6	65,0
240	66,3	6,9	63,5	67,9	60,0	60,9
264	64,6	7,9	52,0	63,9	60,3	59,0

Im zweiten Versuch wurden die Vitamine Biotin, Pantothensäure und Inosit einzeln und in Kombinationen zugesetzt. Aus Tab. 11 geht hervor, daß der Wuchsstoffeffekt des Biotins in Nährlösung B¹ durch Inosit, Pantothensäure und das Gemisch Inosit + Pantothensäure wesentlich gesteigert wird, wobei die Wirkung in der erwähnten Reihenfolge zunimmt. Dagegen läßt sich in Substrat C ein derartiger Einfluß nicht feststellen.

Tabelle 11. *Heferasse: „Ungarn I".*
Impfkultur: Nährlösung A, 48 Std alt. — Impfung: 14. 3. 53. — 5 Parallelen.

Zeit Std	Kein Wuchsstoffzusatz	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml	Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml	meso-Inosit 25 mg/1000 ml	Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml meso-Inosit 25 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml + Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml + meso-Inosit 25 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml + Pantothensäure 2,5 mg/1000 ml meso-Inosit 25 mg/1000 ml
				Nährlösung B¹				
54	98,3	81,6	97,9	98,5	98,2	84,6	79,4	81,1
78	98,2	50,0	97,6	98,0	98,5	41,1	40,1	35,0
96	98,5	34,1	97,5	98,1	97,7	23,8	28,9	22,4
120	98,1	25,6	96,5	97,7	97,6	16,5	19,1	14,1
144	97,9	21,2	96,1	96,6	97,7	12,4	16,9	10,6
168	97,8	19,0	96,0	97,2	97,1	10,3	13,3	8,8
216	97,5	13,8	95,8	97,3	96,2	9,0	11,4	8,4
240	97,3	14,3	95,2	97,0	96,2	9,0	11,3	8,2
				Nährlösung C				
54	89,7	88,6	88,0	88,2	88,8	88,0	86,4	86,1
78	79,6	56,3	78,8	78,1	78,5	58,6	55,1	52,9
96	76,0	29,2	73,6	71,6	73,1	31,9	31,9	28,1
120	65,8	16,8	65,0	65,7	64,8	16,7	18,5	15,9
144	61,1	13,0	58,3	62,2	60,2	11,6	13,4	11,2
168	57,8	10,3	55,6	56,4	54,6	10,1	10,7	9,3
216	51,2	9,3	50,0	50,4	50,5	7,8	9,2	7,5
240	47,0	8,8	47,2	47,5	45,4	8,4	9,4	7,8

Im dritten Versuch mit der Rasse „*Ungarn I*" beabsichtigten wir, die Wirkung verschiedener Kombinationen von Biotin, Adermin und Aneurin mit derjenigen des ersten Vitamins zu vergleichen. Aus Tab. 12 (S. 213) ist ersichtlich, daß Aneurin und besonders das Gemisch Adermin + Aneurin in Nährlösung B¹ den wachstumsfördernden Einfluß des Biotins zu steigern vermögen. Die Kulturen in Substrat C, welche gleichzeitig mit Biotin und Aneurin bzw. Biotin, Adermin und Aneurin versetzt waren, wiesen dagegen im Vergleich zu den Kulturen mit Biotin allein eine Hemmung der Zellvermehrung auf.

Die Heferasse „*Ungarn I*" ist somit gleich wie die von Fiechter (1953) beschriebene Kulturweinhefe „*Polymorphus II*" durch eine ausgeprägte

Biotin-Heterotrophie gekennzeichnet. Bereits nach Zusatz von Biotin allein tritt in beiden Fällen normales Wachstum längs einer S-förmigen, rasch ansteigenden Kurve ein. Ein Unterschied zwischen den zwei Heferassen besteht darin, daß die Zellen von „*Polymorphus II*" in Nährlösung B[1] nach Zusatz von Biotin-haltigen Zweier- und Dreierkombinationen der Vitamine keine größere Vermehrung zeigt als in Anwesenheit des Biotins allein.

Tabelle 12. *Heferasse: „Ungarn I".*
Impfkultur: Nährlösung A, 48 Std alt. — Impfung: 21. 3. 53. — 5 Parallelen.

Zeit Std	Kein Wuchsstoffzusatz	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml	Adermin 0,5 mg/1000 ml	Aneurin 0,5 mg/1000 ml	Adermin 0,5 mg/1000 ml Aneurin 0,5 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml Adermin 0,5 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml Aneurin 0,5 mg/1000 ml	(+)-Biotin 25 γ/1000 ml Adermin 0,5 mg/1000 ml Aneurin 0,5 mg/1000 ml
				Nährlösung B^1				
48	96,8	87,2	97,6	97,2	97,1	88,1	83,6	84,2
72	97,2	56,0	96,6	97,0	97,0	57,6	50,8	49,0
96	96,6	36,4	96,8	97,1	96,8	36,6	33,4	29,9
120	96,5	27,2	96,7	96,7	96,9	24,7	24,8	23,0
144	96,2	21,4	96,1	96,9	96,0	19,5	19,2	18,2
168	96,5	18,0	95,9	96,5	96,3	16,4	14,3	14,6
216	96,5	17,4	96,2	97,2	96,9	15,3	14,3	14,6
240	96,4	16,4	96,5	96,9	96,9	15,3	16,7	14,5
				Nährlösung C				
48	82,5	77,1	81,7	85,3	82,4	81,9	81,1	83,7
72	71,2	51,7	71,1	77,6	76,3	49,2	53,1	51,6
96	58,5	24,4	50,4	67,5	66,3	23,6	31,2	29,7
120	48,3	15,8	49,5	59,6	56,3	17,1	23,5	22,1
144	40,6	11,3	42,2	52,7	49,9	12,2	15,2	14,5
168	40,9	10,5	39,6	51,3	49,1	10,8	13,5	13,0
216	37,5	8,7	34,7	49,9	42,6	10,2	11,6	11,6
240	35,6	9,4	34,7	43,0	44,2	10,1	13,2	12,1

Zusammenstellung der Ergebnisse.

Die Ergebnisse der Untersuchungen über den Bedarf der Kulturweinhefen an wasserlöslichen Vitaminen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Gruppe der Kulturweinhefen weist bezüglich des Bedarfs an Wuchsstoffen für die Vermehrung in synthetischen Nährlösungen, welche Ammoniumsulfat oder Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle enthalten, eine große Heterogenität auf.

„Fendant", „Herrliberg" und „Salenegg".

2. Die Rassen *„Fendant"*, *„Herrliberg"* und *„Salenegg"* sind durch eine ausgeprägte Auxo-Autotrophie gekennzeichnet, indem sie sich in wuchs-

stofffreien Substraten längs einer normalen, S-förmigen, rasch ansteigenden Wachstumskurve vermehren (Wikén u. Richard, 1951a und b, 1952a). Die Hypothese der auxo-heterotrophen Natur der Kulturhefen enthält somit eine unstatthafte Verallgemeinerung.

3. Obgleich die „*Fendant*"-Hefe den Charakter eines auxo-autotrophen Organismus besitzt, reagiert sie sehr empfindlich auf minimale Mengen (+)-Biotin und meso-Inosit, indem bereits in Gegenwart von 0,0025 bis 0,025 γ des ersten bzw. 0,25—2,5 mg des letzten Vitamins pro 1000 ml Substrat eine kleine, aber deutliche Wachstumsstimulierung feststellbar ist. Die fördernde Wirkung einer Kombination der beiden Wuchsstoffe ist gleich groß oder ein wenig größer als diejenige des meso-Inosits allein (Wikén u. Richard, 1951a und b).

4. Im Falle der auxo-autotrophen „*Herrliberg*"- und „*Salenegg*"-Hefen ist (+)-Biotin unwirksam, während meso-Inosit eine bedeutende Stimulierung des Wachstums bewirkt (Wikén u. Richard, 1951b und 1952a).

5. Adermin (Pyridoxin oder Vitamin B_6), Aneurin (Thiamin oder Vitamin B_1) und D(+)-Pantothensäure, einzeln oder in Kombinationen zugesetzt, üben keinen Einfluß auf das Wachstum der auxo-autotrophen Rassen „*Fendant*", „*Herrliberg*" und „*Salenegg*" aus (Wikén u. Richard, 1951a und b, 1952a).

„*Polymorphus II*" *und* „*Ungarn I*".

6. Die Rassen „*Polymorphus II*" (Fiechter, 1953) und „*Ungarn I*" sind (+)-Biotin-heterotroph, indem sie in den synthetischen Substraten mit Ammoniumsulfat bzw. Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle erst nach Zusatz von (+)-Biotin zur maximalen Vermehrung gebracht werden können.

7. Adermin, Aneurin, meso-Inosit und D(+)-Pantothensäure, einzeln oder in verschiedenen Zweier- und Dreiergemischen zugesetzt, bewirken keine Wachstumsstimulierung bei den Hefen „*Polymorphus II*" (Fiechter, 1953) und „*Ungarn I*".

8. Die Wuchsstoffwirkung des (+)-Biotins kann bei der Rasse „*Polymorphus II*" nicht durch Zusatz von Adermin, Aneurin, meso-Inosit oder D(+)-Pantothensäure gesteigert werden. Sogar die Kulturen, welche nebst (+)-Biotin Zweier- oder Dreierkombinationen der erwähnten Vitamine enthalten, weisen Wachstumskurven auf, welche mit denjenigen für die mit (+)-Biotin allein versetzten Kulturen identisch sind (Fiechter, 1953).

9. Im Falle der Rasse „*Ungarn I*" wird in der Nährlösung mit Ammoniumsulfat durch Zusatz von Aneurin, meso-Inosit oder D(+)-Pantothensäure sowie den Gemischen Adermin + Aneurin und meso-Inosit + D(+)-Pantothensäure eine Steigerung des (+)-Biotin-Effekts hervorgerufen. Dagegen kann im caseinhydrolysathaltigen Substrat keine Erhöhung dieses Effekts durch die erwähnten Wuchsstoffe festgestellt

werden. In dieser Nährlösung bewirken Aneurin und die Kombination Adermin + Aneurin eher eine Hemmung der von (+)-Biotin ermöglichten Wachstumsstimulierung.

10. Die (+)-Biotin-heterotrophen Hefen „*Polymorphus II*" (Fiechter, 1953) und „*Ungarn I*" zeigen auf vitaminfreiem Caseinhydrolysat, nicht aber auf Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle eine deutliche Vermehrung ohne irgend einen Zusatz von Wuchsstoffen. Ob dieses Wachstum durch eine langsam verlaufende Synthese von (+)-Biotin in sämtlichen Zellen der betreffenden Hefepopulationen bedingt ist, oder auf das Vorhandensein einer minimalen Anzahl ausgeprägt auxo-autotropher Zellen in den hauptsächlich aus (+)-Biotin-heterotrophen Elementen bestehenden Populationen zurückzuführen ist, läßt sich noch nicht entscheiden. Immerhin ist die Vermehrung eindeutig von irgendeiner Substanz oder Substanzkombination im caseinhydrolysathaltigen Substrat abhängig.

„Dézaley", „Maienfeld Ia" und „Spanien II".

11. Die Rassen „*Dézaley*" (Wikén u. Richard, 1951b und 1952b), „*Maienfeld Ia*" und „*Spanien II*" zeigen eine sehr komplizierte Auxo-Heterotrophie, indem sie in synthetischen Nährlösungen, welche Ammoniumsulfat oder Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle enthalten, erst durch Zusatz von gewissen Dreiergemischen der Vitamine Adermin, Aneurin, (+)-Biotin, meso-Inosit und D(+)-Pantothensäure zur maximalen Vermehrung gebracht werden können. Unter Umständen ermöglichen auch gewisse Zweierkombinationen dieser Wuchsstoffe eine Vermehrung der erwähnten Hefen, welche derjenigen, die in Anwesenheit von drei Vitaminen stattfindet, nur wenig nachsteht, oder diese sogar übertrifft.

12. Bei den Hefen „*Dézaley*" (Wikén u. Richard, 1951b und 1952b) und „*Maienfeld Ia*" wird maximales Wachstum sowohl im ammoniumsulfathaltigen als auch im caseinhydrolysathaltigen Substrat nur nach Zusatz der Dreierkombination (+)-Biotin + meso-Inosit + D(+)-Pantothensäure erhalten. Das gleiche Gemisch ermöglicht auch bei „*Spanien II*" maximale Entwicklung, kann aber bei dieser Rasse in beiden Substraten durch die Kombination (+)-Biotin + Adermin + Aneurin ersetzt werden.

13. Im Falle der „*Dézaley*"-Hefe ermöglicht die Zweierkombination meso-Inosit + D(+)-Pantothensäure eine Vermehrung, welche ohne Induktionsperiode einsetzt und in der caseinhydrolysathaltigen Nährlösung mit sehr großer, im ammoniumsulfathaltigen Medium mit kleinerer aber doch beträchtlicher Geschwindigkeit verläuft (Wikén u. Richard, 1951b und 1952b). Bei der Rasse „*Maienfeld Ia*" übt das Gemisch von meso-Inosit und D(+)-Pantothensäure nur in der Lösung mit Caseinhydrolysat einen wachstumsstimulierenden Einfluß aus, während es im Falle der Hefe „*Spanien II*" in beiden Substraten während angemessenen Bebrütungszeiten praktisch unwirksam ist.

14. Das Zweiergemisch (+)-Biotin + D(+)-Pantothensäure übt auf das Wachstum der „*Dézaley*"-Hefe sowohl mit Ammoniumsulfat als auch mit Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle eine mittelmäßige fördernde Wirkung aus (Wikén u. Richard, 1951b und 1952b), während es in den Kulturen der Rasse „*Spanien II*" nur im ersten Substrat aktiv ist, wobei der günstige Einfluß ebenfalls mittelmäßig stark ist. Im Falle der Hefe „*Maienfeld Ia*" hat die erwähnte Kombination in beiden Nährlösungen einen sehr kräftigen Wuchsstoffeffekt, welcher im caseinhydrolysathaltigen Substrat demjenigen des Dreiergemisches (+)-Biotin + meso-Inosit + D(+)-Pantothensäure nur wenig nachsteht.

15. In gleichzeitiger Anwesenheit der beiden Vitamine (+)-Biotin und meso-Inosit läßt sich bei der „*Dézaley*"-Hefe eine Interferenz von antagonistischer Natur nachweisen (Wikén u. Richard, 1951b und 1952b). Sowohl in der ammoniumsulfathaltigen als auch in der caseinhydrolysathaltigen Nährlösung ermöglicht meso-Inosit allein eine Vermehrung dieser Hefe, welche ohne Induktionsperiode einsetzt und in angemessenen Zeiten zu einer verhältnismäßig kleinen Höchstausbeute an Zellen führt. Durch Zusatz von (+)-Biotin wird nun dieser Wuchsstoffeffekt des meso-Inosits in jungen Kulturen stark gehemmt, in alten Kulturen dagegen wesentlich gesteigert. In quantitativer Hinsicht (Zellenzahl beim Einsetzen des antagonistischen Effekts, Dauer der Hemmungsphase) ist die Interferenz von der zur Impfung der Kulturen verwendeten Zellmenge abhängig. Bei der Rasse „*Maienfeld Ia*" ist meso-Inosit allein in beiden Substraten unwirksam, während die gleichzeitig mit (+)-Biotin und meso-Inosit versetzten Kulturen eine gleich große oder etwas größere Zellvermehrung zeigen als die Kulturen mit (+)-Biotin allein. Im Falle der Hefe „*Spanien II*" ist meso-Inosit allein ebenfalls durchgehend inaktiv. Die Zweierkombination (+)-Biotin + meso-Inosit übt bei dieser Hefe in der ammoniumsulfathaltigen Nährlösung eine wesentlich kräftigere Wachstumsstimulierung aus als (+)-Biotin allein, während sie im Substrat mit Caseinhydrolysat gleich wie das letzte Vitamin völlig unwirksam ist.

16. Im Falle der Hefen „*Dézaley*" (Wikén u. Richard, 1951b und 1952b) und „*Maienfeld Ia*" ist die Wirkung der Zweiergemische (+)-Biotin + Adermin und (+)-Biotin + Aneurin gleich groß wie diejenige des ersten Vitamins allein. In den Kulturen der Rasse „*Spanien II*" mit Ammoniumsulfat ist der wachstumsfördernde Einfluß der ersten Kombination wesentlich größer und der des letzten Gemisches ein bißchen größer als die Wirkung des (+)-Biotins allein. In der caseinhydrolysathaltigen Nährlösung dagegen, wo (+)-Biotin allein unwirksam ist, ermöglicht das Gemisch dieses Wuchsstoffs mit Aneurin eine Vermehrung der Hefe „*Spanien II*", welche sogar bedeutend schneller verläuft als diejenige, die in Gegenwart der Dreierkombinationen (+)-Biotin + meso-

Inosit + D(+)-Pantothensäure und (+)-Biotin + Adermin + Aneurin festgestellt werden kann. Das Gemisch von (+)-Biotin und Adermin bewirkt auf Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle nur eine geringe Wachstumsstimulierung.

17. In den Kulturen der „*Dézaley*"-Hefe mit Caseinhydrolysat bewirkt (+)-Biotin allein über angemessene Bebrütungszeiten keine Förderung des Wachstums, während es in der ammoniumsulfathaltigen Nährlösung nach einer gewissen Induktionsperiode einen starken Wuchsstoffeffekt ausübt (Wikén u. Richard, 1951b und 1952b). Bei der Rasse „*Maienfeld Ia*" übt das erwähnte Vitamin in beiden Substraten einen deutlichen fördernden Einfluß aus, wobei die Wirkung in Gegenwart von Ammoniumsulfat am größten ist. Im Falle der Hefe „*Spanien II*" ist (+)-Biotin im caseinhydrolysathaltigen Substrat völlig inaktiv, während es in der Nährlösung mit Ammonsulfat in den meisten Versuchen eine geringe Stimulierung des Wachstums hervorruft.

18. Nach Zusatz von meso-Inosit allein setzt bei der „*Dézaley*"-Hefe sowohl auf Ammoniumsulfat als auch auf Caseinhydrolysat Vermehrung sofort nach der Impfung ein. Diese führt in angemessenen Zeitspannen nur zu einer verhältnismäßig geringen Höchstausbeute an Zellen (Wikén u. Richard, 1951b und 1952b). Im Falle der Rassen „*Maienfeld Ia*" und „*Spanien II*" ist meso-Inosit in beiden Substraten unwirksam.

19. D(+)-Pantothensäure übt bei der „*Dézaley*"-Hefe in der caseinhydrolysathaltigen Nährlösung nach einer relativ kurzen Induktionsperiode, in dem Substrat mit Ammoniumsulfat erst nach einer beträchtlichen Zeitspanne einen günstigen Einfluß auf die Zellvermehrung aus. (Wikén u. Richard, 1951b und 1952b). Bei der Rasse „*Maienfeld Ia*" bewirkt das erwähnte Vitamin nur auf Caseinhydrolysat eine Wachstumsstimulierung, während es in den Kulturen der Hefe „*Spanien II*" auf beiden Substraten völlig inaktiv ist.

20. Die Wuchsstoffe Adermin und Aneurin sind bei den Hefen „*Dézaley*" (Wikén u. Richard, 1951b und 1952b) und „*Maienfeld Ia*" durchgehend unwirksam. Dagegen rufen diese Vitamine unter Umständen bei der Rasse „*Spanien II*" eine geringe Wachstumsstimulierung hervor, wobei Adermin sowohl in der ammoniumsulfathaltigen als auch in der caseinhydrolysathaltigen Nährlösung, Aneurin aber nur im letzten Medium aktiv ist. Das Gemisch dieser Wuchsstoffe ist in beiden Substraten wirksam.

21. Ohne Zusatz von Vitaminen zeigen die Hefen „*Dézaley*" (Wikén u. Richard, 1951b und 1952b) und „*Spanien II*" in den meisten Versuchen mit angemessenen Bebrütungszeiten nur auf Ammoniumsulfat eine geringe Vermehrung, während eine solche bei der Rasse „*Maienfeld Ia*" nicht nur in der ammoniumsulfathaltigen, sondern auch in der caseinhydrolysathaltigen Nährlösung stattfindet. Die Geschwindigkeit der langsamen Assimilation der wuchsstofffreien synthetischen Substrate

ist von der Größe der zur Impfung der Kulturen verwendeten Zellmenge abhängig.

22. Aus den oben in aller Kürze zusammengefaßten Ergebnissen geht nicht nur die große Heterogenität der Gruppe der Kulturweinhefen bezüglich des Bedarfs an wasserlöslichen Vitaminen für normales Wachstum, sondern auch die Abhängigkeit der Wirkung der Wuchsstoffe von der Zusammensetzung der betreffenden Kultursubstrate klar hervor. In diesem Zusammenhang seien die folgenden denkwürdigen Äußerungen eines Altmeisters der Vitaminforschung zitiert: „The statement that an organism is heterotrophic is valid only for the cultural conditions given and only when these conditions are under careful physico-chemical control. For a given organism the number of cultural conditions is enormous. Before it can be determined with certainty that heterotrophism is complete and genetically controlled, it is necessary to exhaust all possible cultural conditions" (Schopfer, 1949, S. 200).

23. Die Gruppe der Kulturweinhefen weist zahlreiche Beispiele der Erscheinung auf, daß bei ein und derselben Heferasse die gleiche Wachstumsstimulierung durch Zusatz verschiedener Wuchsstoffe und Wuchsstoffgemische hervorgerufen werden kann („replacement of factors" gemäß Schopfer, 1949, S. 123, 135, 142 und 208ff.). Weitere Untersuchungen über die Vermehrung der Kulturweinhefen in Gegenwart wasserlöslicher Vitamine in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen würden sicher Ergebnisse von prinzipieller Bedeutung für die Frage der Spezifität der Wuchsstoffwirkung und dadurch für das Gebiet der mikrobiologischen Vitamin- und Aminosäurebestimmung zeitigen.

24. Wie bereits erwähnt, gehören die bis jetzt untersuchten Weinheferassen „*Fendant*" (Wikén u. Richard, 1951a und b), „*Herrliberg*" und „*Salenegg*" (Wikén u. Richard, 1951b und 1952a), „*Dézaley*" (Wikén u. Richard, 1951b und 1952b), „*Polymorphus II*" (Fiechter, 1953) sowie „*Maienfeld Ia*", „*Spanien II*" und „*Ungarn I*" zur Gruppe der Kulturweinhefen, d. h. es handelt sich in sämtlichen Fällen um Heferassen, welche gemäß einer in verschiedenen Arbeiten (z. B. Fries, 1938, S. 1; Schopfer, 1949, S. 126; Rippel-Baldes, 1952, S. 129) wiedergegebenen Hypothese ursprünglich zwar einen auxo-autotrophen Charakter besaßen, diesen aber bei der Fortzüchtung und Aufbewahrung im Laboratorium verloren haben und nunmehr ausgeprägte Auxo-Heterotrophie aufweisen sollten. Es konnte ja nun nachgewiesen werden, daß die „*Fendant*"-, „*Herrliberg*"- und „*Salenegg*"-Hefen auxo-autotroph sind und die erwähnte Hypothese mithin keine allgemeine Gültigkeit hat. Im Hinblick auf diese Tatsache wäre es von großem Interesse, den Wuchsstoffbedarf bei einer Anzahl derjenigen Hefen zu untersuchen, aus welchen die bei den spontanen (wilden) Weingärungen auftretenden Populationen zusammengesetzt sind.

Zusammenfassung.

Der Bedarf der Kulturweinhefen „*Maienfeld 1a*", „*Spanien II*" und „*Ungarn I*" an wasserlöslichen Vitaminen für das Wachstum in synthetischen Substraten wurde durch Messung des Absorptionsvermögens der Kulturen für Licht der Wellenlänge 660 mμ mit Hilfe des BECKMAN-Spektrophotometers untersucht. Nebst Mineralsalzen enthielten die Nährlösungen Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle sowie Ammoniumsulfat oder vitaminfreies Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle. Geprüft wurde die Wirkung der Wuchsstoffe Adermin, Aneurin, (+)-Biotin, meso-Inosit und D(+)-Pantothensäure. Zum Vergleich werden die Ergebnisse der im hiesigen Institut durchgeführten Untersuchungen über den Wuchsstoffbedarf der Kulturweinhefen „*Fendant*" (WIKÉN u. RICHARD, 1951a und b), „*Herrliberg*" und „*Salenegg*" (WIKÉN u. RICHARD, 1951b und 1952a) sowie „*Dézaley*" (WIKÉN u. RICHARD, 1951b und 1952b) und „*Polymorphus II*" (FIECHTER, 1953) erörtert. Die Resultate der erwähnten Untersuchungen können wie folgt zusammengefaßt werden:

Die Gruppe der *Kulturweinhefen* ist bezüglich des Bedarfs an Wuchsstoffen für das Wachstum in synthetischen Substraten, welche Ammoniumsulfat oder Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle enthalten, durch eine große Heterogenität gekennzeichnet. Gewisse Rassen, wie „*Fendant*", „*Herrliberg*" und „*Salenegg*", sind auxo-autotroph, indem sie ohne irgendeinen Zusatz von Vitaminen eine synthetische Nährlösung rasch assimilieren können. Andere Rassen, wie „*Dézaley*", „*Maienfeld 1a*" und „*Spanien II*" zeigen eine sehr komplizierte Auxo-Heterotrophie, indem sie in den synthetischen Medien erst durch Zusatz von gewissen Dreiergemischen der Wuchsstoffe Adermin, Aneurin, (+)-Biotin, meso-Inosit und D(+)-Pantothensäure zur maximalen Vermehrung gebracht werden können. Unter Umständen ermöglichen auch gewisse Zweierkombinationen von Wuchsstoffen ein rasches Wachstum dieser Hefen. Zwischen dem auxo-autotrophen „*Fendant*"-Typus einerseits und dem auxo-heterotrophen, durch einen sehr komplizierten Wuchsstoffbedarf gekennzeichneten „*Dézaley*"-Typus anderseits gibt es Kulturweinhefen, welche intermediäre Vitaminansprüche aufweisen. Beispielsweise sind die Rassen „*Polymorphus II*" und „*Ungarn I*" ausgeprägt (+)-Biotin-heterotroph. Bei der ersten Rasse läßt sich die Wuchsstoffwirkung des (+)-Biotins nicht durch Zusatz von Adermin, Aneurin, meso-Inosit oder D(+)-Pantothensäure steigern, während bei der letzten Rasse eine Steigerung des (+)-Biotin-Effekts durch andere Vitamine in der ammoniumsulfathaltigen Nährlösung bewirkt wird.

Die oben erwähnten Befunde zeigen, daß die Hypothese der auxo-heterotrophen Natur der Kulturhefen keine allgemeine Gültigkeit hat. Gewisse Kulturweinhefen sind durch eine ausgeprägte Auxo-Autotrophie gekennzeichnet. Ferner besitzen einige der auxo-heterotrophen Rassen das Vermögen, sich in völlig wuchsstofffreien Nährlösungen langsam zu vermehren. Dabei wird von gewissen Hefen, wie „*Polymorphus II*" und „*Ungarn I*", nur das caseinhydrolysathaltige, von anderen Hefen, wie „*Dézaley*" und „*Spanien II*" nur das ammoniumsulfathaltige Substrat

in angemessenen Bebrütungszeiten assimiliert. Es gibt aber auch auxo-heterotrophe Rassen, welche, wie „*Maienfeld Ia*", in beiden Substraten ohne Wuchsstoffzusatz langsam wachsen.

Aus den Versuchsergebnissen geht ferner klar hervor, daß die Wirkung der verschiedenen Wuchsstoffe und Wuchsstoffkombinationen auf die Vermehrung der Kulturweinhefen von der Zusammensetzung der Kultursubstrate stark abhängig ist. Zur Charakteristik des fördernden oder nicht-fördernden Einflusses der Vitamine auf das Wachstum dieser Hefen gehören somit unbedingt auch detaillierte Angaben über die Komponenten der betreffenden Nährlösungen.

Bei einigen auxo-heterotrophen Kulturweinhefen läßt sich unter Umständen eine Interferenz von antagonistischer Natur zwischen gewissen Wuchsstoffen nachweisen. Beispielsweise wird in jungen Kulturen der Rasse „*Dézaley*" die wachstumsstimulierende Wirkung des meso-Inosits durch Zusatz von (+)-Biotin gehemmt. In quantitativer Hinsicht (Zellenzahl beim Einsetzen des antagonistischen Effekts, Dauer der Hemmungsphase) ist diese Interferenz von der Zellmenge abhängig, welche zur Impfung der Kulturen verwendet wurde.

Die Gruppe der Kulturweinhefen umfaßt ferner Rassen, bei welchen in ein und derselben Nährlösung die gleiche Wachstumsstimulierung durch Zusatz verschiedener Wuchsstoffe und Wuchsstoffkombinationen hervorgerufen werden kann. Weitere Untersuchungen über diese Erscheinung („replacement of factors" gemäß Schopfer, 1949) wären im Hinblick auf die Frage der Spezifität der Wuchsstoffwirkung sehr wünschenswert.

Die vorliegende Arbeit gehört in den Rahmen der Untersuchungen über die Physiologie der Weinhefen, welche von der Abteilung für Landwirtschaft des Eidg. Volkswirtschaftsdepartements aus dem Weinbaufonds unterstützt werden. Den zuständigen Behörden sprechen wir den herzlichsten Dank aus. Fräulein R. Buchmann und Fräulein A. Mohler danken wir bestens für sorgfältige Assistenz. Die Überlassung der Heferassen „*Maienfeld Ia*", „*Spanien II*" und „*Ungarn I*" verdanken wir Herrn Professor Dr. F. Kobel und Herrn Dr. H. Lüthi, Eidg. Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil.

Literatur.

Atkin, L., P. P. Gray, W. Moses and M. Feinstein: European Brewery Convention, Congr. Lucerne I, 96 (1949). — Copping, A. M.: Biochemic. J. **23**, 1050 (1929). — Fiechter, A.: Schweiz. Z. allg. Path. **16**, 845 (1953). — Fries, N.: Symbolae bot. Upsalienses **3**, H. 2 (1938). — Lüthi, H.: Mitt. Eidg. Versuchsanstalt Wädenswil, Flugschr. **12** (1947). — Modess, O.: Symbolae bot. Upsalienses **5**, H. 1 (1941). — Rippel-Baldes, A.: Grundriß der Mikrobiologie. Berlin 1952. — Schopfer, W. H.: Plants and Vitamins. Waltham, Mass. 1949. — Stelling-Dekker, N. M.: Die sporogenen Hefen. Amsterdam 1931. — Wikén, T., und O. Richard: Antonie van Leeuwenhoek **17**, 209 (1951a); **18**, 31 (1952a); **18**, 293 (1952b). — Schweiz. Z. allg. Path. **14**, 560 (1951b). — Williams, R. J., und Mitarb.: Univ. Texas Publ. No. 4137 (1941).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 221—229 (1954).

(Aus dem Hygiene-Institut der Universität Mainz.)

Der Einfluß niederer Wechselströme auf die enzymatische Tätigkeit von Sproßpilzen unter aeroben Kulturbedingungen.

Von
Sven Carlson.

(Eingegangen am 23. Juli 1953.)

In Fortführung der Versuche von Kliewe und Neidl über den stimulierenden Effekt von Stromstößen auf das Wachstum von *Bakterien* untersuchten wir den Einfluß niederer Wechselströme von 30—60 mAmp. und intermittierendem Strom von 100 mAmp. auf die enzymatische Tätigkeit von *Sproßpilzen* in der anaeroben Gärung. Unter dieser Behandlung trat eine Beschleunigung des Gärungsablaufes ein, die anfänglich verhältnismäßig groß war und 75—100% gegenüber der unbehandelten Kontrolle betrug. Im weiteren Verlauf sank diese Reaktionsbeschleunigung durch die vermehrte Alkoholproduktion. Nach Ablauf der Gärung blieb eine erhöhte Alkohol- und Kohlensäuremenge gegenüber der unbehandelten Kontrolle bestehen. Diese erhöhte enzymatische Tätigkeit muß als eine Stimulierung durch den niederen Wechselstrom aufgefaßt werden. Eine Temperaturerhöhung und Änderung der Wasserstoffionenkonzentration trat unter dieser Behandlung nicht ein. Ebenso ließ sich keine zusätzliche Kohlensäurebildung durch den Zerfall intermediärer Gärungsprodukte, wie z. B. der Brenztraubensäure, unter dem Einfluß von niederem Wechselstrom nachweisen. Gärversuche mit Hefeplasmolysesaft zeigten diese Gärungsbeschleunigung nicht. Weiter ließ sich in unseren Versuchen durch das Aceton-Trockenverfahren der Hefen eine geringe Gewichtserhöhung gegenüber der unbehandelten Kontrolle feststellen, die jedoch nicht allein ausschlaggebend für den vermehrten Zuckerabbau sein dürfte. Nicht geklärt war hierbei die Frage, wie die Hefen sich unter dem Einfluß von niederem Wechselstrom unter aeroben Kulturbedingungen verhalten. Unter der anaeroben Gärung bleibt der Glucoseabbau beim Äthylalkohol stehen. Damit geht der größte Teil der im Zucker enthaltenen Energie in dieses Produkt über.

Die Bruttogleichung von Gay-Lussac gestattet, die höchstmögliche Ausbeute an Alkohol und Kohlensäure aus Zucker anzugeben, wenn auch der Mechanismus dieser chemischen Umwandlung, der zwar durch

die Arbeiten von Neubauer, Neuberg und in späteren Jahren von Meyerhof weitgehend aufgeklärt wurde, heute noch seiner endgültigen Lösung, namentlich bei der vitalen Gärung, harrt.

Unsere Kenntnisse über die Vorgänge beim Hefewachstum bezüglich der Ausbeute des eingesetzten Zuckers oder anderer Kohlenstoffverbindungen oder unter dem Einfluß von Wuchsstoffen stützen sich auf wenig gesichertes Versuchsmaterial. Die meisten Autoren haben bei ihren experimentellen Untersuchungen mit den weniger geeigneten Kulturhefen gearbeitet. Man stößt deshalb oft auf erhebliche Widersprüche.

Die Vermehrung der Hefe wird durch den Sauerstoff der Luft angeregt, allerdings verschieden stark bei den einzelnen Rassen. Diese Steigerung der biologischen Stoffsynthese wird hauptsächlich durch die Beschleunigung des Atmungsstoffwechsels und durch die korrelative Verringerung des Alkoholanfalles ausgelöst. Beides sind weitgehendst Funktionen der Lüftungsintensität, die bei den einzelnen Heferassen recht unterschiedlich sein kann. Eine *Bierhefe* wird sich unter intensiver Sauerstoffzufuhr viel stärker vermehren, aber sie wird nach wie vor trotz Sauerstoffzufuhr reichlich Alkohol produzieren. Die *Bäckerhefe* ist dagegen schon wesentlich wendiger. Sie wächst bei starker Belüftung außerordentlich stark, bildet aber immer noch gewisse Mengen an Alkohol, während die wilden Hefen sich fast ausschließlich unter Sauerstoffzufuhr vermehren.

Eingehender mit dem Problem der Gärdauer für Stellhefe, der Belüftung, Hefeeinsaatmenge, Verdünnung der Melasse sowie p_H-Führung befaßt sich die Arbeit von Pfundt. Fink u. Krebs untersuchten dagegen den Einfluß der Belüftung auf *Torula*-Hefen im synthetischen Medium unter Zusatz verschiedener reiner Zuckerarten und Biosfaktoren.

Eine interessante Zusammenstellung der hauptsächlichsten Arbeiten über die Vorgänge beim Aufbau der Hefesubstanz und den möglichen Ausbeuten bei der Hefezüchtung stellt die Abhandlung von Lechner dar.

Eine Bruttogleichung für die maximale Hefevermehrung ließ sich nicht mit Sicherheit aufstellen, weil diese unvergleichbar komplizierten Vorgänge beim Aufbau der mannigfaltig zusammengesetzten Hefezellsubstanz bisher keine gesicherten Angaben ermöglichten. Fink, Lechner u. Krebs erhielten mit *Torula*-Hefen aus 100 g reinem Traubenzucker und verschiedenen Nährsalzen 210 g Hefe, 53,2 g CO_2 und 0,02 g Alkohol. Diese äußerst geringe Alkoholproduktion war nur mit *Torula*-Hefen möglich. Aus Versuchen von Braun u. Pfundt, die mit Stellhefe arbeiteten, geht hervor, daß zur Zeit der Angärung eine kräftige Alkoholbildung einsetzt, die auch in den weiteren Stunden anhält und erst im späteren Verlauf sinkt durch die Assimilation des Alkohols, die auch bei Anwesenheit von Zucker stattfinden soll. Nach Angaben von Claasen soll jedoch bei Anwesenheit von Zucker kein Alkohol assimiliert werden, da dies den Gesetzen der Diffusion widersprechen würde. Ferner konnte Claasen bei der Assimilation von Alkohol keine Vermehrung der Zellzahl mehr beobachten, jedoch eine Vermehrung des Trockengewichtes nachweisen.

Da der Alkoholgehalt sich hemmend auf die Vermehrung der Hefen auswirkt, ist man in Großbetrieben zum Zulaufverfahren übergegangen. Die Nährlösung

wird auf 1—2% Nährstoffgehalt eingestellt und entsprechend dem Verbrauch nachgefüllt. Diese geringen Mengen an Alkohol, die bei diesem Verfahren bei der Stellhefe entstehen, werden rasch wieder assimiliert.

In unseren Versuchen verzichteten wir auf das Zulaufverfahren und auf größere Hefeeinsaatmengen, die in größeren Gäransätzen etwa 15 bis 20% der Gesamtmelasse betragen. Ferner gingen wir von einer höheren Zuckerkonzentration aus, um eine Assimilation des Alkohols weitgehendst auszuschließen. Folgende Fragen waren bei unserer Versuchsdurchführung von Interesse: 1. Wie verhält sich unter dem Einfluß von niederem Wechselstrom die bei der enzymatischen Tätigkeit der Hefen gebildete Kohlensäuremenge gegenüber der unbehandelten Kontrolle; 2. welchen Einfluß hat der Wechselstrom auf die Alkoholbildung der Hefen und 3. in welchem Maße tritt eine Vermehrung der Hefesubstanz unter dem Einfluß des Wechselstromes ein?

Methodik.

Zur Nährbodenaufnahme dienten uns Kolben mit angeschmolzenen Fritten und zwei zusätzlichen Stutzen zum Einführen der Kohlenstäbe. Um gleiche Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurde auch das Kontrollgefäß mit Kohlenstäben versehen. Der Durchmesser der Kohlenstäbe betrug 1,0 cm, die Eintauchtiefe 7,0 cm und der Elektrodenabstand 8,0 cm. Als Stromquelle benutzten wir 220 V-Wechselstrom von 50 H/sec, dessen Stromstärke entsprechend den gewählten Versuchsbedingungen durch Vorschaltwiderstände geändert wurde. Die Temperatur überprüften wir mit zwei in $^1/_{10}$ Graden gradierten Thermometern, die in die Nährbodenflüssigkeit hineinragten. Die sich bildende Kohlensäure banden wir — wie wir es in der Methodik der anaeroben Versuche beschrieben hatten — nach vorangegangener Reinigung in konz. Schwefelsäure an normale Kalilauge und leiteten sie zu diesem Zweck durch zwei hintereinander geschaltete Kalilaugeflaschen. Gleichzeitig fand vor und nach Ablauf der Gärung eine Gewichtsbestimmung der Gärkolben statt. Die durch die Kulturgefäße gepumpte Luft reinigten wir von der anhaftenden Kohlensäure und von Luftkeimen durch ein Natronkalkrohr und sterile Watte. Unter Kontrolle von Rotametern wurden die Gärgefäße auf gleiche Belüftungsmengen eingestellt und während des Versuchsablaufes ständig überprüft.

Die gebildete Alkoholmenge bestimmten wir nach der gleichen Methode, die wir für die anaeroben Versuche entwickelt hatten sowie in pyknometrischen Bestimmungen. Die gebildeten Hefen wurden in Aceton aufgeschwemmt, bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Den Gesamt- und Restzucker wiesen wir nach vorangegangener Inversion mit der von Bayersdorfer abgeänderten Bestimmung von Kjehldahl und Bertrand nach. Als Nährboden verwandten wir in üblicher Weise geklärte Melasse und ein synthetisches Medium nach Hayduck. Die Schaumbildung der Melasse nach Belüftung hemmten wir durch Zusätze von sogenanntem „Gärfett".

Ergebnisse.

Entsprechend dem Arndt-Schulzeschen Gesetz wirken stärkere Reize hemmend und schwächere Reize fördernd auf die Entwicklung und den Stoffwechsel von Mikroorganismen. Wir untersuchten deshalb in den

folgenden Versuchen den Einfluß verschiedener Stromstärken auf eine *Stellhefe I* (Tab. 1—3). Zur besseren Übersicht sind sämtliche Versuche hintereinander aufgeführt und werden anschließend gemeinsam besprochen.

Tabelle 1.

Versuch A: 30 mAmp. — Nährboden: 1000 cm³ Melasse; Zuckergehalt: 18,23%; p_H-Wert: 5,8; Luft: 66 l/Std; Beimpfungsmenge: 5 g Stellhefe I.

	Gebildete Kohlensäure in g:			
Std	Versuch	stündl. Zunahme	Kontrolle	stündl. Zunahme
8	7,74	4,29	6,42	2,37
12	24,90	3,50	15,92	2,64
16	38,90	3,00	28,48	2,52
24	62,96	1,57	48,70	1,87
32	75,51	0,92	63,76	1,55
36	79,20		67,98	
End-p_H-Wert:	4,95		4,95	
Restzucker:	0,6%		2,8%	
Gebildeter Alkohol:	7,22%		5,92%	
Aceton-Trockengew. d. gebild. Hefe:	13,29 g		12,75 g	

Tabelle 2.

Versuch B: 60 mAmp. — Nährboden: 1000 cm³ Melasse; Zuckergehalt: 22,08%; p_H-Wert: 6,05; Luft: 66 l/Std; Beimpfungsmenge: 5 g Stellhefe I.

	Gebildete Kohlensäure in g			
Std	Versuch	stündl. Zunahme	Kontrolle	stündl. Zunahme
8	10,22	4,92	8,88	2,23
12	29,92	4,69	17,81	4,56
16	48,71	3,71	36,04	4,03
24	78,42	2,54	68,32	2,41
32	98,77	1,75	87,63	1,04
36	105,78		91,81	
End-p_H-Wert:	5,5		5,5	
Restzucker:	0%		1,8%	
Gebildeter Alkohol:	9,48%		8,44%	
Aceton-Trockengew. d. gebild. Hefe:	14,285 g		13,46 g	

In dem folgenden Versuch (Tab. 4) wurde statt der Stellhefe I die gärstärkere „*obergärige Bierhefe*" gewählt, um zu untersuchen, wie sich ihre enzymatische Tätigkeit unter dem Einfluß des Wechselstromes gegenüber der Stellhefe verhält.

Tabelle 3.

Versuch C: 100 mAmp. intermittierend (1 min Stromdurchgang, 4 min Ruhepause); Nährboden: 1000 cm³ Melasse; Zuckergehalt: 24,62%; p_H-Wert: 6,1; Luft: 66 l/Std; Beimpfungsmenge: 5 g Stellhefe I.

Std	Gebildete Kohlensäure in g: Versuch	stündl. Zunahme	Kontrolle	stündl. Zunahme
8	14,76	5,54	11,08	4,89
12	37,64	5,25	30,67	4,34
16	58,67	2,69	48,02	3,12
24	80,17	2,30	73,09	2,59
32	98,64	1,64	93,87	1,01
36	105,22		97,91	
End-p_H-Wert:	5,1		5,1	
Restzucker:	1,5%		3,0%	
Gebildeter Alkohol:	9,88%		8,98%	
Aceton-Trockengew. d. gebild. Hefe:	13,27 g		12,865 g	

Tabelle 4.

Versuch D: 40 mAmp.; Nährboden: 1000 cm³ Melasse; Zuckergehalt: 15,86%; p_H-Wert: 6,05; Luft: 66 l/Std; Beimpfungsmenge: 4 g obergärige Bierhefe.

Std	Gebildete Kohlensäure in g: Versuch	stündl. Zunahme	Kontrolle	stündl. Zunahme
8	10,81	4,19	5,87	3,52
12	27,56	4,06	19,96	3,03
16	43,82	2,74	32,07	2,39
24	63,60	1,21	51,21	1,34
32	73,32	0,46	61,94	0,56
36	75,06		64,17	
End-p_H-Wert:	4,8		4,8	
Restzucker:	0%		1,6%	
Gebildeter Alkohol:	7,26%		5,84%	
Aceton-Trockengew. d. gebild. Hefe:	11,647 g		11,254 g	

In den Versuchen E und F (Tab. 5 u. 6) ersetzten wir die Melasse durch den synthetischen Nährboden nach HAYDUCK, der ein besseres Leitvermögen gegenüber Melasse besitzt, jedoch auf Grund der fehlenden Biosfaktoren den Hefen schlechtere Entwicklungsmöglichkeiten bietet.

Besprechung.

Wie aus den Tabellen zu entnehmen ist, trat unter dem Einfluß von niederem Wechselstrom unter aeroben Kulturbedingungen eine Steigerung der Stoffwechseltätigkeit der Hefen ein. Eine Temperaturerhöhung,

Tabelle 5.

Versuch E: 40 mAmp.; Nährboden: 1000 cm³ synthetischer Nährboden nach Hayduck; Zuckergehalt: 16,6%; p_H-Wert: 6,4; Beimpfungsmenge: 5 g Stellhefe I; Luft: 66 l/Std.

	Gebildete Kohlensäure in g			
Std	Versuch	stündl. Zunahme	Kontrolle	stündl. Zunahme
8	6,74	2,35	3,42	1,47
12	16,16	2,68	10,31	1,84
16	26,88	2,12	17,67	1,57
24	43,86	0,91	30,22	0,95
32	51,16	0,94	37,82	1,23
36	54,94	0,51	42,74	0,58
44	59,06		47,42	
End-p_H-Wert:	3,75		3,7	
Restzucker:	4,0%		6,4%	
Gebildeter Alkohol:	5,64%		4,22%	
Aceton-Trockengew. d. gebild. Hefe:	6,87 g		6,662 g	

Tabelle 6.

Versuch F: 100 mAmp. intermittierend (1 min Stromdurchgang, 4 min Ruhepause); Nährboden: 1000 cm³ synthetischer Nährboden nach Hayduck; Zuckergehalt: 20%; p_H-Wert: 6,5; Beimpfungsmenge: 5 g Stellhefe I; Luft: 66 l/Std.

	Gebildete Kohlensäure in g			
Std	Versuch	stündl. Zunahme	Kontrolle	stüdl. Zunahme
8	5,76	2,79	4,67	2,04
16	28,07	1,87	20,96	1,9
24	43,03	1,70	35,41	0,96
32	56,66	0,44	43,11	0,69
40	66,16		48,62	
End-p_H-Wert:	4,2		4,05	
Restzucker:	6,9%		9,5%	
Gebildeter Alkohol:	5,85%		4,42%	
Aceton-Trockengew. d. gebild. Hefe:	7,64 g		7,225 g	

die zu einer beschleunigten enzymatischen Tätigkeit führen kann, konnten wir durch genaueste Temperaturmessungen ausschließen. In unseren behandelten und unbehandelten Proben betrug die Temperatur gleichbleibend 23° C. Es handelte sich um einen Mittelwert der optimalen Arbeitsbedingungen der von uns verwendeten Heferassen. Wie wir früher bereits beschrieben hatten (s. oben), ist für enzymatische Tätigkeit der Hefen die Wasserstoffionenkonzentration von entscheidender Bedeutung. Wir führten deshalb unsere Versuche bei einem p_H zwischen 5,5 und 6,5 durch. Die aktuelle Acidität wurde elektrometrisch gemessen. Sie nahm

in Versuch und Kontrolle in gleichem Verhältnis zu, was für einen gleichen biochemischen Ablauf der enzymatischen Tätigkeit spricht. Die Kohlensäureentwicklung, die uns in unseren anaeroben Versuchen als Maßstab der fortschreitenden Gärung diente, konnten wir in unseren aeroben Versuchen nur begrenzt verwerten, weil es sich um das gleiche Endprodukt zweier grundverschiedener biochemischer Umsetzungen handelt, nämlich der Alkoholbildung und der Verhefung des Substrates. Als weitere Schwierigkeit muß in Erwägung gezogen werden, ob nicht außerdem Spuren der Luftkohlensäure mitgerissen wurden.

Nach 12—16stündiger Versuchsdauer zeigte sich in unseren strombehandelten Versuchsgefäßen eine deutlich höhere Kohlensäureentwicklung. Diese Steigerung betrug bei Melassenährböden und Stellhefe in Versuch A, 12 Std nach der Beimpfung bei Anwendung von 30 mAmp. gegenüber der unbehandelten Kontrolle 56,4%; in Versuch B, 12 Std nach der Beimpfung bei 60 mAmp. 67,9% und in Versuch C, ebenfalls 12 Std nach der Beimpfung bei 100 mAmp. intermittierendem Strom 22,7%. Für die *Stellhefe* erwies sich damit als günstigste Stromstufe 60 mAmp. Ein nicht so günstiges Ergebnis lieferte die *obergärige Bierhefe* in Versuch D. Die Steigerung betrug hier 12 Std nach der Beimpfung bei 40 mAmp. 38,0%. Die synthetischen Nährböden zeigten gegenüber der Melasse nach 12stündiger Versuchsdauer in ihrem Reaktionsablauf keinen nennenswerten Unterschied. So betrug in Versuch E bei 40 mAmp. die Steigerung 56,7% und im Versuch F, 16 Std nach der Beimpfung bei 100 mAmp. intermittierendem Strom 33,9%.

Auf Grund dieser anfänglich stärkeren Kohlensäureentwicklung stellten wir uns die Frage, ob diese auf einer wesentlichen Vermehrung der Hefen oder einer Steigerung der enzymatischen Tätigkeit der Hefen beruht. Durchgeführte Zwischenversuche, die 12 und 16 Std nach der Beimpfung unterbrochen wurden, ließen erkennen, daß diese vermehrte Kohlensäurebildung unter dem Einfluß des Wechselstromes mit einer vermehrten Alkoholproduktion verbunden war und keine nennenswerte Ausbeute an Hefesubstanz aufwies. Zu einer Assimilation dieses vermehrt erzeugten Alkohols kam es durch das reichliche Zuckerangebot nicht.

Betrachten wir die Tabellen der Kohlensäurebildung, so wird nach der anfänglich hohen Differenz im weiteren Versuchsablauf die positive Beschleunigung gegenüber der unbehandelten Kontrolle durch die ständig ansteigende Alkoholkonzentration immer kleiner und bleibt gegen Versuchsende unter den Werten der Kontrolle zurück. In Tab. 7 sind zur besseren Übersicht der Endergebnisse die aus dem Zucker entstandenen Mengen an Alkohol, Kohlensäure sowie der verbleibende Restzucker in Prozent und das Aceton-Trockengewicht der Hefen in g aus 1 Liter Nährmedium angegeben.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die unter aeroben Kulturbedingungen entstehende Kohlensäuremenge unter dem Einfluß von niederem Wechselstrom am Endpunkt des Reaktionsablaufes gegenüber der Kontrolle etwas erhöht ist, und auch die aus dem angebotenen Zucker entstandene Alkoholmenge eine deutliche Steigerung erfährt. Diese etwas höhere Alkoholausbeute ist besonders in einem Teil der Versuche mit niederen

Tabelle 7. *Gebildete Alkohol- und Kohlensäuremenge aus der in 100 cm³ enthaltenen Zuckermenge unter Berücksichtigung des Restzuckers in Prozent und Aceton-Trockengewicht der Hefen aus 1000 cm³ Medium.*

	g Zucker in 100 cm³	mAmp.	% C_2H_5OH	% CO_2	% Restzucker	g Hefen-T.G.
			Melasse-Nährboden. Versuche mit Stellhefe I			
Versuch A . .	18,23	30	39,60	43,44	3,3	13,29
Kontrolle . .			32,41	37,29	15,4	12,79
Versuch B . .	22,68	60	42,93	46,64	∅	14,285
Kontrolle . .			37,21	40,48	8,15	13,46
Versuch C . .	24,62	100 (intermittierend)	40,13	42,74	6,07	13,27
Kontrolle . .			36,47	39,76	12,14	12,865
			Versuch mit obergäriger Bierhefe			
Versuch D . .	15,86	40	45,77	47,32	∅	11,647
Kontrolle . .			36,82	40,35	10,0	11,254
			Synthetischer Nährboden nach Hayduck. *Versuche mit Stellhefe I*			
Versuch E . .	16,6	40	33,97	35,56	24,09	6,87
Kontrolle . .			25,42	28,56	38,55	6,62
Versuch F . .	20,0	100 (intermittierend)	29,25	30,08	34,50	7,64
Kontrolle . .			22,10	24,31	47,50	7,225

Stromstufen von 30—60 mAmp. ausgeprägt und von der Nährbodenzusammensetzung und der verwandten Heferasse abhängig.

Von weiterer wesentlicher Bedeutung war für uns die Bestimmung der entwickelten Hefemenge. Wie eingangs erwähnt, wählten wir hierfür das Aceton-Trockenverfahren, d. h. die Hefen wurden in Aceton aufgeschwemmt und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. In allen strombehandelten Kulturen trat eine geringe Vermehrung der Hefen ein. Sie betrug bei der Stellhefe gegenüber der unbehandelten Kontrolle im Versuch A 3,9%, im Versuch B 6,1%, im Versuch C 3,1% und bei Verwendung der obergärigen Bierhefe im Versuch D 3,5%. Annähernd gleiche Ergebnisse lieferte uns auch der synthetische Nährboden nach Hayduck im Versuch E mit 3,7% und im Versuch F mit 5,6%. Es zeigte sich

hier ebenfalls, daß die niederen Stromstufen zwischen 30 und 60 mAmp. sich am günstigsten erwiesen. Diese geringe Vermehrung der Hefen ist auf den stimulierenden Effekt des Wechselstromes zurückzuführen, jedoch dürfte der Einfluß des Wechselstromes vorwiegend eine Steigerung der enzymatischen Tätigkeit der Sproßpilze bewirken.

Von weiterem Interesse war für uns, ob diese strombehandelten Hefen bei Überimpfung auf ein frisches Nährmedium auch ohne weitere Strombehandlung diese gesteigerte enzymatische Tätigkeit beibehalten. Als Ausgangskulturen wählten wir neben einer unbehandelten Kontrolle eine 36 Std alte aerob gezüchtete Stellhefe, die unter dem Einfluß von 60 mAmp. Wechselstrom gestanden hatte. Nach Überimpfung auf einen neuen gleichprozentigen Melassenährboden war jedoch die Kohlensäure-, Alkohol- und Hefemenge in beiden Kulturen annähernd gleich. Demnach kann angenommen werden, daß der stimulierende Effekt nur solange anhält, als Strom durch die Kulturen geleitet wird. Es kommt nicht zu einer Bildung von mutierten Hefen.

Zusammenfassung.

Unter dem Einfluß von niederem Wechselstrom trat bei der enzymatischen Tätigkeit der Hefen in belüfteten Kulturen eine vermehrte Kohlensäure- und Alkoholproduktion ein. Die Hefetrockensubstanz war um 3—6% vermehrt. Die Wasserstoffionenkonzentration und die Temperatur änderte sich gegenüber der Kontrolle unter dem Einfluß des Wechselstromes nicht. Strombehandelte Hefen auf ein neues Medium überimpft zeigten keine Steigerung der Sproß- und enzymatischen Tätigkeit. Mutationen wurden bei den Hefen nicht beobachtet. Der Stromeffekt wird auf eine Reizwirkung zurückgeführt.

Literatur.

Braun, W., u. R. Pfundt: Biochem. Z. **187**, 115 (1936). — Carlson, S.: Arch. f. Hyg. **137**, 85 (1953). — Claasen, H.: Z. Spiritusind. **1936**, 440; **1934**, 159. — Z. d. Ver. Deutsch. Zuckerind. **84**, 84 (1934); **77**, 607 (1927). — Z. angew. Chem. **39**, 443 (1926). — Biochem. Z. **228**, 154 (1930). — Fink, H.: Vorratspflege u. Lebensmittelforschg **1**, 52 u. 107 (1938). — Fink, H., u. J. Krebs: Biochem. Z. **299**, 1 (1938). — Lechner, R.: Forschungsdienst **2**, 409 (1936). — Meyerhof, O.: Biochem. Z. **162**, 43 (1925); **226**, 16 (1930). — Münder, H.: Wschr. Brauerei **28**, 221 (1938). — Pfundt, R.: Biochem. Z. **291**, 237 (1937).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 230—234 (1954).

(From the Department of Organic Chemistry and Enzymology, Fordham University, New York 58, N. Y.)

Application of Mixed Substrates to the Study of Pyruvic Acid Formation by Fusarium lini Bolley*.

By

R. J. Coleman and F. F. Nord.

(Eingegangen am 28. November 1953.)

In earlier investigations from this laboratory, cognizance was taken of the central role which pyruvic acid or glycol aldehyde occupy, when hexoses and pentoses are split or dehydrogenated by *Fusaria* (Sciarini and Nord, 1943; Wirth and Nord, 1943; Goepfert and Nord, 1942). Thus, it was shown that products such as ethanol, acetic acid and acetaldehyde, which may be regarded as potential precursors for the formation of active two carbon units, are all derivable from pyruvic acid. Our earlier investigations (Wirth and Nord, 1941, 1942) have shown that one important factor, which influences the amount of pyruvic acid detectable in the growth medium of *Fusarium lini* Bolley (*FlB*), is the nitrogen source. When the effect of nitrate ions was compared to other nitrogen sources, it was found that with the former pyruvic acid accumulated to a considerable extent in the growth medium. The reduction of nitrate to nitrite and the ensuing interaction of this latter substance with the carboxylase system brought about this result (Sciarini and Nord, 1944, 1945). A similar accumulation of pyruvic acid was also observed, when certain naphthoquinones were added to the culture media (Maselli and Nord, 1952). In other experiments employing labelled carbon, we were able to assess the relative contributions of glucose and acetate carbon to the synthesis of fatty acids by *FlB*. It was therefore of further interest to study the effect of a mixed carbon source on the accumulation of pyruvic acid by this organism.

Experimental.

The molds were grown in flasks containing 200 cc. of nutrient medium whose basic composition was the same as that previously reported (Coleman and Nord,

* Communication No. 282. On the Mechanism of Enzyme Action L VI. This work was carried out under the aegis of the Office of Naval Research and was aided in part by a grant from the F. G. Cottrell Fund. The data presented were taken from a part of the dissertation of R. J. C. submitted to the Graduate School of Fordham University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. For the previous paper in this series see Biochim. Biophys. Acta **12** (Warburg-Festschrift), 56 (1953).

1952). The substrates in these studies were used either singly or in conjunction with each other. In all experiments the total amount of carbon present initially was the same. In the case of mixed carbon sources the concentration of each substrate was so chosen that equal amounts of carbon were contributed by each nutrient. Inoculation was effected by means of a spore suspension from a three day old culture of *FlB.*

The mycelia were separated by filtration and hereafter washed, dried and weighed. The p_H value of the different media were recorded by means of a glass electrode. Residual glucose was determined gravimetrically ("Methods of Analysis", 6th ed. 1946). The pyruvic acid accumulated in the media was measured colorimetrically using a COLEMAN-Nepho-Colorimeter (FRIEDEMANN and HAUGEN, 1943). Determination of dry weight mycelia, p_H of the media, residual glucose and accumulated pyruvic acid were begun on the fifth day after inoculation and succeeding measurements were performed at different time intervals.

Results.

Table 1. *Effect of a Mixed Substrate on the Mat Weights of Fusarium lini Bolley.*

Series No.*	Days after Inoculation						
	5	7	9	12	15	19	21
	Mat Weights[1]						
1	0.022	0.037	0.097	0.520	0.782	1.473	1.503
2	0.053	0.635	0.865	1.474	1.420	1.177	1.142
3	0.474	0.914	1.240	1.717	1.543	1.304	1.298

* 1) 7.2 g. acetate carbon. — 2) 3.6 g. acetate carbon; 3.6 g. glucose carbon. — 3) 7.2 g. glucose carbon.

[1] g./2 mats.

The mat weights are recorded in Table 1. It is significant to note that, when glucose was present in the media, the mat weights reached a maximum value between the 12th and 15th day after inoculation. However, when acetate was the sole substrate, the mat weights showed a steady increase, and a maximum value was not obtained within the same experimental period.

Table 2. *Pyruvic Acid Contents of the Culture Media of Fusarium lini Bolley*.*

Series No.**	Days after Inoculation						
	5	7	9	12	15	19	21
	mg./200 ml.						
1	0.0	3.4	4.4	19.1	36.0	9.0	8.2
2	406.0	760.0[1]	166.0	97.2	13.1	5.5	5.4
3	589.0	655.0[2]	453.0	137.5	17.8	3.2	3.0

* Duplicate determinations based on pooled media from 2 FERNBACH flasks $\pm$ 2%. — ** Substrate concentrations as given in Table 1.

[1] $p_H = 6.45$. — [2] $p_H = 4.00$.

The amounts of pyruvic acid accumulated are recorded in Table 2. It can be seen from the data that in series 1, which has acetate as the sole substrate, the pyruvic acid values show a steady increase up to the 15th day after inoculation. Comparing this now with the other data, the differences, both in the position of the maxima and the amounts of pyruvic acid present, are striking. The possibility exists that the large accumulation of pyruvic acid in series 2 was a result of the nearly neutral p_H of the media, but this does not seem likely in view of the fact that in series 3 the prevailing p_H was in the acid region for the greater part of the growing time and pyruvate accumulation was of the same order of magnitude as in series 2.

In order to correlate the pyruvic acid values with the amount of glucose utilized after the same time interval, the amounts of residual glucose were determined, and the values are shown in Table 3.

Table 3. *Residual Glucose Contents of the Media at Different Time Intervals.* mg./200 ml.

Series No.*	Days after Inoculation			
	5	7	9	12
2	808	204	trace	—
3	628	174	trace	—

* Substrate concentrations as given in Table 1.

It can be seen from the above table that in both cases glucose disappeared from the media after the 7th day. It will be recalled that the amounts of pyruvic acid, which accumulated in the media also began to decrease after the 7th day. In view of the fact that series 3 contained twice as much glucose as series 2 it is apparent that the glucose was initially utilized at a higher rate, when it served as the sole substrate. It was also possible to relate the amount of pyruvic acid present in the media to the theoretical value calculated on the basis of the glucose utilized. These data were obtained for the maxima in the pyruvic acid values, and it was found that when a mixed substrate was used 48% of the theoretical amount of pyruvate was present in the media while in series 3 only 20% was present. In series 2 the very large change in pyruvic acid contents between the 7th and 12th day is reflected in the substantial increase in the mat weights during this same time interval.

Discussion.

In view of the fact that significant quantities of acetaldehyde can be trapped during pyruvate utilization by *FlB*, it appears justifiable to assume that the principal mechanism operative for the formation of two carbon units from pyruvate is decarboxylation. Pyruvate can be formed

via two pathways in a system in which glycolysis is occurring, i. e., directly from the carbohydrate or *via* the dicarboxylic or tricarboxylic acid cycle. With the mixed substrates the contribution from this latter pathway can be estimated, if the values found for the acetate medium are used as indices. Since nitrate served as the nitrogen source in our experiments, the magnitude of the pyruvic acid accumulations is probably due to this factor. However, since the same quantities of nitrate were employed in all of the present experiments, the relative differences in the pyruvic acid values are still significant.

When acetate was the substrate, the pyruvic acid content of the medium did not reach a maximum value until the 15th day. This latter finding affords some insight as to the mechanism operative when large amounts of pyruvate accumulate in the medium. The reduction of nitrate to nitrite may occur by the acceptance of hydrogen, made available by dehydrogenases during the splitting of the carbohydrates. Our data support this viewpoint, since the accumulation of pyruvate was negligible in a system in which glycolysis did not occur. Furthermore, coinciding with the disappearance of carbohydrate from the growth medium, there was a very noticeable decrease in the accumulated pyruvic acid as evidenced by the data recorded in Table 2.

Furthermore, since glucose has been reported to yield two carbon units identical with those derivable from acetate for fatty acid synthesis (French and Popják, 1951), this occurring presumably *via* pyruvic acid, it is improbable that the increased accumulation of pyruvate during glycolysis in the presence of added acetate is due to any inhibition of the carboxylase system by acetate. Indeed, we have previously observed in studies on the formation of unsaturated fatty acids by *FlB* (Coleman and Nord, 1953) that there was a large increase in the extent of desaturation when the carbon source consisted of both acetate and glucose.

In conclusion it should be noted that the addition of nicotinic acid to the culture medium also resulted in an increased accumulation of pyruvic acid (Wirth and Nord, 1941, 1942).

Summary.

1. The effect of a mixed carbon source on pyruvic acid formation was studied using acetate and glucose as substrates.

2. Within the same experimental period the mat weights, when acetate was the sole substrate, did not pass through a maximum value.

3. When acetate and glucose were incorporated into the same medium, or when only glucose was used, maximum pyruvic acid values were obtained on the 7th day. In the case of acetate a maximum value was not found until the 15th day.

References.

Coleman, R. J., and F. F. Nord: Arch. of Biochem. a. Biophys. **38**, 385 (1952); **45**, 83 (1953). — French, T. H., and G. Popják: Biochemic. J. **49**, 183 (1951). — Friedemann, T. E., and G. E. Haugen: J. of Biol. Chem. **147**, 415 (1943). — Goepfert, G. J., and F. F. Nord: Arch. of Biochem. **1**, 292 (1942). — Maselli, J. A., and F. F. Nord: Arch. of Biochem. a. Biophys. **39**, 406 (1952). — Methods of Analysis, Assoc. Offic. Agr. Chem., 6th ed., Washington, D. C. 1946. — Sciarini, L. J., and F. F. Nord: Arch. of Biochem. **3**, 261 (1943); **5**, 435 (1944); **7**, 367 (1945). — Wirth, J. C., and F. F. Nord: Arch. of Biochem. **1**, 143 (1942); **3**, 463 (1943); J. Am. Chem. Soc. **63**, 2855 (1941).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 235—242 (1954).

(From the Department of Oceanography and the Department of Microbiology, School of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A.)

Enzymes involved in the utilization of carbohydrates by two strains of myxobacteria*.

Von

THEODORE J. STARR and HAROLD P. KLEIN.

With 3 figures in the text.

(Eingegangen am 4. Januar 1954.)

A voluminous literature exists concerning the pathways of utilization of carbohydrates by microorganisms. The details of these degradative processes have been largely filled in, particularly for such organisms as the yeasts and certain members of the *Eubacteriales*. On the other hand, very little information is available regarding the intermediary metabolism of members of the order *Myxobacteriales*.

During the course of an investigation of marine members of this order, several pure cultures of marine myxobacteria were obtained, which were studied with respect to cytological, morphological and physiological characteristics (STARR, 1953). In addition, two of these strains were analyzed for enzymes concerned with carbohydrate utilization, and it is the purpose of this paper to present some of the results obtained with crude enzyme preparations.

Methods.

Organisms used.

Details concerning the isolation and characterization of the cultures used in this work are available elsewhere (STARR). The organism designated *PO4* has been included in the genus *Cytophaga*, while organism *BS4* was placed in the genus *Sporocytophaga*[1].

Media.

Stock cultures of these organisms were maintained on media in which 0.05% each of yeast extract, beef extract and tryptone, and 1% Difco agar, were dissolved in sea water.

For the preparation of crude enzyme mixtures, the organisms were grown in 200 ml batches of the following medium, contained in liter ERLENMEYER flasks: NaCl,

* Supported in part by State of Washington funds for medical and biological research, and in part by the Office of Naval Research under Contract N80nr-520/III with the University of Washington.

[1] Organism *PO4* hydrolyzes gelatin, agar, chitin, and starch, but does not decompose cellulose. *BS4* degrades none of these substrates.

2.5%; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.08%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.04%; $(NH_4)_2SO_4$, 0.001%; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.0001%; yeast extract, beef extract, tryptone, 0.02% each; amino acid supplement[1], 0.1 ml per 100 ml; vitamin supplement[2], 0.5 ml per 100 ml; glucose, 0.1%. All media were sterilized at 12 lbs. for 12 min.

Enzyme preparation.

The inoculated flasks were incubated at 10 to 15° C on a rotary shaker for 6 to 10 days, after which the cells were harvested by centrifugation and washed once with phosphate buffer (0.05 M, p_H 6.8). Extracts were prepared by grinding one part of packed cells with one part of levigated alumina (HAYAISHI and STANIER, 1951). The mixture was taken up in five parts, by volume, of the same buffer and centrifuged at 10,000 rpm for 30 min in a Sorvall centrifuge, after which the slightly opalescent, yellow supernatant was removed and frozen prior to further use. The entire extraction procedure was carried out at 5 to 10° C.

Hexokinase activity was determined by measuring the disappearance of free reducing sugar upon incubation of the cell extracts with glucose, or fructose, and adenosine triphosphate (KLEIN, 1953). Glucose-6-phosphate comes to equilibrium with fructose-6-phosphate when incubated with the enzyme phosphohexose isomerase (MEYERHOF, 1933). Accordingly, the assay for this enzyme was performed by determining the increase in fructose content (ROE, 1934) in a system containing the crude enzyme preparation and glucose-6-phosphate. The assay procedure used for the measurement of 6-phosphofructokinase was based on the finding (see below) that these organisms contain the enzyme aldolase. Fructose-6-phosphate and adenosine triphosphate were incubated with the extracts, and triose phosphate was trapped and estimated according to the methods of SIBLEY and LEHNINGER (1949). When fructose-1,6-diphosphate was the starting substrate, the same trapping methods served to identify aldolase. Triosephosphate dehydrogenase activity was measured spectrophotometrically (WARBURG and CHRISTIAN, 1939), using fructose-1,6-diphosphate as the substrate, once again taking advantage of the presence of aldolase.

Spectrophotometric assays for glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase were performed using conventional techniques (SCOTT and COHEN, 1953). Determinations were also made for the splitting enzyme of ENTNER and DOUDOROFF (1952) by incubating extracts with 6-phosphogluconate anaerobically, according to the assay procedure of these authors.

All spectrophotometric assays were performed at room temperature using a Beckmann DU spectrophotometer.

[1] L-arginine · HCl — 0.6%; L-asparagine — 0.6%; L-histidine-HCl — 0.2%; DL-α-alanine — 0.6%; L-hydroxyproline — 0.012%; L-leucine — 0.1%; DL-lysine · HCl — 0.2%; DL-methionine — 0.12%; DL-phenylalanine — 0.08%; L-proline — 0.08%; DL-serine — 0.2%; DL-threonine — 0.2%; L-tyrosine — 0.08%; L-tryptophane — 0.1%; DL-valine — 0.1%; DL-isoleucine — 0.1%; L-glutamic acid — 1.0%; glycine — 1.0%.

[2] Thiamin · HCl — 5 mg%; Niacin — 10 mg%; Ca pantothenate — 5 mg%; Riboflavin — 1 mg%; Pyridoxine · HCl — 2 mg%; Pyridoxamine · HCl — 1 mg%; p-Aminobenzoic acid — 1 mg%; Biotin — 20 μg%; Choline · HCl — 100 mg%; i-Inositol — 100 mg%; Folic acid — 10 μg%; Vitamin B-12 — 5 μg%.

Chemicals used.

All the inorganic chemicals used in this work were of C.P. grade, as were also the sugars glucose and fructose. The phosphate esters, glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate and fructose-1,6-diphosphate were purchased as barium salts from Schwartz Chemical Co. 6-phosphogluconic acid was prepared from glucose-6-phosphate by the method of SEEGMILLER and HORECKER (1951). Adenosine triphosphate (ATP) was purchased from Pabst Co., while diphosphopyridine nucleotide (DPN, 20% purity) and triphosphopyridine nucleotide (TPN, 80% purity) were obtained from Sigma Chemical Company.

Results.

Hexokinase.

Extracts prepared from cells grown with glucose as the energy source readily phosphorylate glucose in the presence of ATP (table 1). On the other hand, for both of these preparations fructose serves as a poor substrate for phosphorylation. These results can be interpreted in one of two ways: either glucose-grown cells contain a single hexokinase that is

Table 1. *Hexokinase activity of extracts of PO4 and BS4*[1].

Substrate	*PO4* extract μM/ml	*BS4* extract μM/ml
Glucose, initial	3.11	3.79
Glucose, final	0.78	0.70
Fructose, initial	2.97	3.67
Fructose, final	2.27	2.43

[1] Each tube contained approximately 5 micromoles substrate, 10 micromoles ATP, 10 micromoles $MgCl_2$, 25 micromoles phosphate buffer (p_H 7.0) and 0.5 ml enzyme preparation in a total volume of 1.5 ml. Incubation at 30° C for 60 min. Controls without ATP, or without enzyme, showed no sugar disappearance.

capable of phosphorylating glucose and fructose at very different rates, or the cells contain unequal amounts of glucokinase and fructokinase, as a result of the adaptive formation of glucokinase during growth on glucose. The latter possibility appears less likely in view of the fact that growth of these organisms with fructose is generally much slower than with glucose. Furthermore, the behavior of extracts of fructose-grown cells is entirely analogous to that of extracts of cells grown with glucose. This situation appears to be similar to that reported recently for *Pseudomonas putrefaciens* (KLEIN, 1953).

Phosphohexose isomerase.

Table 2 presents data relevant to the determination of phosphohexose isomerase. It is clear that glucose-6-phosphate is converted to a fructose ester, and that equilibrium is attained in approximately 60 minutes under these conditions.

Table 2. *Phosphohexose isomerase activity in extracts of PO4 and BS4*[1].

Extract	Incubation, in minutes			
	0	30	60	90
PO4	0.79[2]	1.47	1.58	1.68
BS4	0.50	1.30	1.52	1.56

[1] The complete reaction mixture, incubated at 30° C, contained 0.3 ml (6.3 micromoles) glucose-6-phosphate, 0.2 ml 0.05 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer (p_H 8.0) and 0.5 ml enzyme preparation. At times indicated, 0.2 ml samples were removed, heated at 100° C for 5 min and tested for fructose. Control tubes without enzyme showed no increase in fructose content; tubes without substrate gave no test for fructose.

[2] Results are expressed as micromoles fructose per ml.

6-Phosphofructokinase and Aldolase.

These enzymes were shown to be present in both organisms. From table 3, it is seen that triose phosphates are formed only when fructose-1,6-diphosphate or fructose-6-phosphate plus ATP are present in the incubation mixture. In the latter case, since the total amount of triose phosphate formed is considerably lower than from hexose diphosphate, the

Table 3. *Aldolase and 6-phosphofructokinase in extracts of PO4 and BS4.*

Substrates added	*PO4* extract	*BS4* extract
fructose 1,6 diphosphate[1]	130[2]	116
fructose-6-phosphate plus ATP[3]	38	34
fructose-6-phosphate	18	18
fructose-6-phosphate plus ATP; no enzyme	18	18
none	18	18

[1] In testing for aldolase, the complete reaction mixture contained 1.0 ml 0.05 M tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer (p_H 8.6), 0.1 ml 0.1 M fructose-1-6-diphosphate, 0.25 ml 0.56 M hydrazine (p_H 8.6) and 0.2 ml enzyme, in a total volume of 2.5 ml. Incubation was at 30° C for 30 min.

[2] Results expressed as numerical readings given by triose chromogen at 525 mμ, using a Fisher electrophotometer, model B.

[3] For 6-phosphofructokinase determination, the complete mixture contained 1.0 ml 0.05 M tris buffer (p_H 7.7), 0.1 ml 0.1 M fructose-6-phosphate, 0.1 ml 0.1 M ATP, 0.1 ml 0.1 M $MgCl_2$ and 0.2 ml enzyme, in a total volume of 2.25 ml. After 60 min incubation at 30° C, 0.25 ml 0.56 M hydrazine was added and the mixture incubated another 30 min. (This modified procedure for trapping triose was necessary because hydrazine completely inhibited the kinase reaction.)

phosphorylation reaction appears to be rate-limiting. These results also would be expected if the extracts contained aldolase in excess of that required for glycolysis, as do several mammalian tissues (SIBLEY and LEHNINGER).

Triosephosphate dehydrogenase.

Figure 1 shows the reduction of DPN by extracts of organism *BS4* in the presence of hexose diphosphate. Similar results were obtained with organism *PO4*. In both organisms, TPN cannot substitute for DPN in this reaction.

The further degradation of triose phosphate was not investigated.

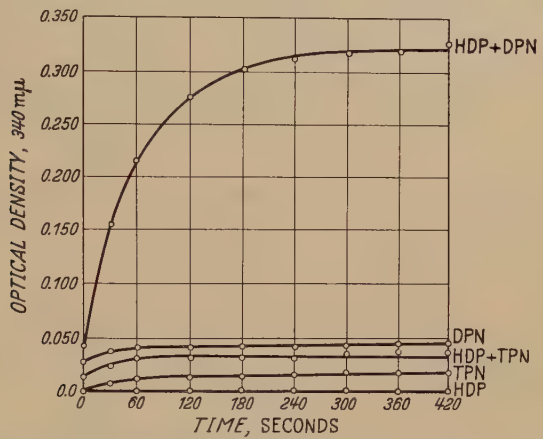


Figure 1. DPN reduction by extract of BS4 in the presence of hexose diphosphate. — The complete reaction mixture contained 0.1 ml 0.1 M hexose diphosphate, 0.1 ml DPN (0.15 micromoles) or TPN (0.14 micromoles), 0.1 ml 5.3% sodium arsenate, 0.2 ml enzyme preparation, and enough 0.004 M cysteine — 0.05 M tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer (p_H 8.5) to bring the total volume to 3.0 ml.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase and "6-phosphogluconate" dehydrogenase.

Determinations were made also for enzymes involved in the so-called "hexose monophosphate shunt" pathway. Enzymes catalyzing the conversion of glucose-6-phosphate to pentose phosphates via 6-phosphogluconate have now been demonstrated in several microorganisms (Horecker, 1951). In both organisms under study here, enzymes involved in the oxidation of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate have been demonstrated. Figure 2 illustrates the results obtained in experiments with extracts of *BS4*. The presence of a TPN-specific system for the oxidation of glucose-6-phosphate, and of a DPN-specific system for 6-phosphogluconate oxidation, is thus indicated. The detailed nature of this latter reaction has yet to be worked out. Preliminary experiments in which the phosphogluconate system was coupled to the reduction of acetaldehyde by yeast alcohol dehydrogenase failed to reveal an accumulation of pentose. In this respect, the enzyme system involved in the oxidation of 6-phosphogluconate appears to be similar to that found in *Leuconostoc mesenteroides* (De Moss, 1953).

It should also be noted that Wood and Schwerdt, working with extracts of *Pseudomonas fluorescens*, found a DPN-specific enzyme capable of oxidizing 6-phosphogluconate to pentose (1953). In addition, however, and accounting for the major disappearance of 6-phosphogluconate, these extracts contained a system that catalyzes the cleavage of this substrate to pyruvate and triose phosphate. This pathway, first demonstrated in *Pseudomonas saccharophila* (Entner and Doudoroff),

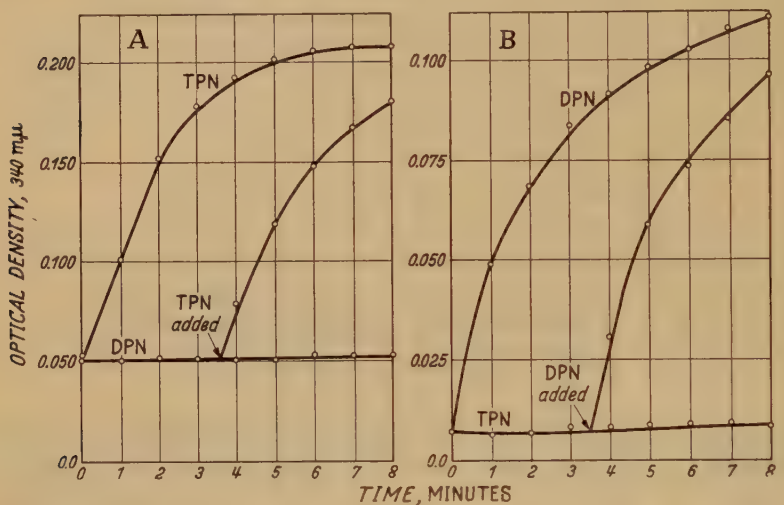


Figure 2. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and "6-phosphogluconate" dehydrogenase in extracts of *BS4*. — A. Oxidation of glucose-6-phosphate: the complete reaction mixture contained 0.1 ml glucose-6-phosphate (2.1 micromoles), 0.1 ml TPN (0.07 micromoles) or DPN (0.075 micromoles) 0.1 ml enzyme preparation, and 0.05 M tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer (p_H 8.0) to give a total of 3.0 ml. At 3.5 min, 0.1 ml TPN added to cuvette containing DPN as the oxidant. — B. Oxidation of "6-phosphogluconate". The complete mixture contained 0.2 ml 6-phosphogluconate (2.0 micromoles), 0.05 ml DPN (0.04 micromoles) or TPN (0.035 micromoles), 0.1 ml enzyme preparation, and 0.05 M tris buffer (p_H 8.0) to give a total of 3.0 ml. At 3.5 min, 0.05 ml DPN added to cuvette containing TPN as the oxidant.

does not seem to play an important role in organism *BS4*, for in an experiment in which extracts of *BS4* and *Pseudomonas saccharophila* were incubated separately in the presence of 6-phosphogluconate under anaerobic conditions, only the *Ps. saccharophila* preparation yielded a positive test for pyruvic acid, when tested for by the method of Friedemann and Haugen (1943).

The reaction in which DPN is reduced in the presence of 6-phosphogluconate is under further study. It is possible, of course, that the actual substrate oxidized in this reaction is not 6-phosphogluconate but triose phosphate. An initial cleavage of 6-phosphogluconate to triose phosphate plus another 3-carbon fragment, followed by oxidation of the triose phosphate, could account for the results obtained in these experiments.

Discussion.

In the absence of manometric and isotopic data, it is unwise to do more than speculate concerning the pathway(s) of glucose degradation in the organisms studied here. However, much useful information can be obtained from the study of isolated enzymatic reaction steps, and a tentative sequence of reactions patterned after well-recognized schemes in other microorganisms is given in Figure 3. It is impossible at this time to say whether the metabolism of glucose actually proceeds via either or both of these routes. Only carbon balance studies and experiments with labeled substrates will shed light on this question.

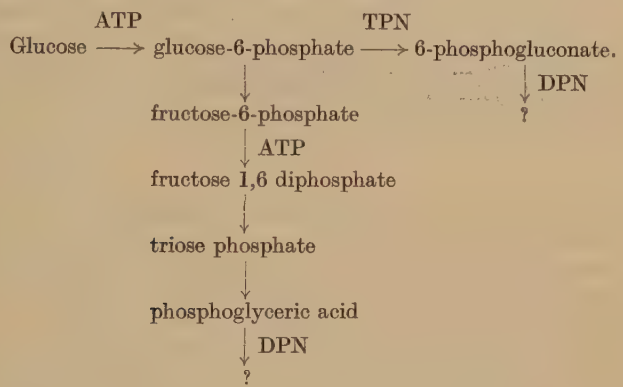


Figure 3. Postulated scheme for the initial stages of glucose degradation in extracts of *BS4* and *PO 4*.

The presence of a virtually intact glycolytic system also leads one to speculate on the possibility that these organisms carry out a fermentation under anaerobic conditions. To date, however, attempts to grow them under strictly anaerobic conditions have failed. Furthermore, both organisms contain cytochromes and are strongly positive for catalase and cytochrome oxidase (Starr). It would appear, therefore, that these are essentially oxidative organisms. The finding of enzymes involved in glycolysis in a strictly aerobic organism is not unique. *Pseudomonas fluorescens*, for example, has also been shown to contain many of these enzymes (Wood and Schwerdt).

Summary.

Extracts prepared from two strains of myxobacteria, grown with glucose as the primary carbon source, have been shown to contain a hexokinase that phosphorylates glucose to a greater extent than fructose. Phosphohexose isomerase, 6-phosphofructokinase, aldolase and a DPN-specific triose phosphate dehydrogenase are also present. In addition a

TPN-specific glucose-6-phosphate dehydrogenase and a system catalyzing the reduction of DPN in the presence of 6-phosphogluconate have also been demonstrated.

References.

De Moss, R. D.: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **41**, Suppl. 1, 207 (1953). — Entner, N., and M. Doudoroff: J. of Biol. Chem. **196**, 853 (1952). — Friedemann, T. F., and G. E. Haugen: J. of Biol. Chem. **143**, 415 (1943). — Hayaishi, O., and R. Y. Stanier: J. Bacter. **62**, 691 (1951). — Horecker, B. L.: in Phosphate Metabolism, Vol. 2, 117—144, The Johns Hopkins Press (1951). — Klein, H. P.: J. Bacter. **66**, 650 (1953). — Meyerhof, O.: Nature (Lond.) **132**, 337 (1933). — Roe, J. H.: J. of Biol. Chem. **107**, 15 (1934). — Scott, D. B. Mc., and S. S. Cohen: Biochemic. J. **55**, 23 (1953). — Seegmiller, J. E., and B. L. Horecker: J. of Biol. Chem. **192**, 175 (1951). — Sibley, J. A., and A. L. Lehninger: J. of Biol. Chem. **177**, 859 (1949). — Starr, T. J.: Doctoral Thesis, Univ. Washington (1953). — Warburg, O., and W. Christian: Biochem. Z. **303**, 40 (1939). — Wood, W. A., and R. F. Schwerdt: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **41**, Suppl. 1, 165 (1953).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 243—260 (1954).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster.)

Cytologische Untersuchungen an Azotobacter chroococcum Beij.

Von

Eberhard Floethmann.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Januar 1954.)

Untersuchungen nach Feulgen *und* Robinow.

Im Vordergrund der cytologischen Forschung bei Bakterien steht seit langer Zeit die Frage nach dem Kern der Bakterienzelle (siehe Sammelreferate von Pietschmann 1931, Milovidov 1935, Piekarski 1949 und Schussnig 1953).

Die ersten Beobachtungen in dieser Hinsicht an *Azotobacter* erfolgten durch Mencl (1911), der mit Heidenhainschem Hämatoxylin, Giemsafarbstoff und anderen zahlreiche Körnchen innerhalb der Azotobacterzelle darstellen konnte, die er für Chromatin hielt. Doch bieten die benutzten Färbemethoden nach unserer heutigen Auffassung dafür keine Gewähr. Weitere Untersuchungen zum Nachweis eines Kernes mit basischen Farbstoffen liegen von Prazmowski (1912), Bonazzi (1915), Jones (1914), Beauverie (1925, 1928) und Petschenko (1930) vor. Mit Hilfe der Nuclealreaktion stellte zuerst Neumann (1930, 1941) eine diffus im Plasma verteilte feulgenpositive Substanz fest. Eine streng lokalisierte positive Nuclealreaktion in den Zellen von *Azotobacter agilis* fand Delaporte (1939).

Eine eindeutige Klärung der Kernverhältnisse des *Azotobacter* konnte bisher nicht erzielt werden.

Als Material für die eigenen Untersuchungen dienten *Azotobacter*-Stämme, die aus verschiedenen Bodenproben der näheren Umgebung Münsters und des Botanischen Gartens isoliert wurden. Die Reinheitsprüfung dieser Kulturen erfolgte regelmäßig mikroskopisch nach dem Acridinorange-Schnellfluorochromierungsverfahren nach Strugger (1949) sowie durch Kultur auf Bouillon- und Peptonagar (den Dooren de Jong 1938). Da das Wachstum dieses Bakteriums auf dem Elektivnährboden nach Beijerinck (1901) mit der Zeit erheblich nachläßt, wurde zur Weiterzüchtung ein Ashby-Agar benutzt.

Für die Durchführung der Feulgenschen Nuclealreaktion ist eine einwandfreie Fixierung erforderlich. Es wurden daher verschiedene Flüssigkeiten wie Äthylalkohol, Methylalkohol, Sublimat wäßrig konzentriert, Sublimatalkohol nach Schaudinn, Gemisch nach Carnoy, Gemisch nach Flemming, Osmiumtetroxyd und Eisessig auf ihre Eignung geprüft. Die Dauer der Fixierung betrug 20—30 min, bei der Räucherung mit Osmiumtetroxyd 1—2 min. Die Vorversuche, die an *Azotobacter* sowie vergleichsweise an Epidermiszellen von *Allium Cepa* durchgeführt wurden, ergaben, daß bei Anwendung von Osmiumtetroxyd und Chrom-Osmium-Essigsäure die Farbreaktion nur sehr schwach ausfiel, bei *Azotobacter* konnte häufig eine negative Reaktion festgestellt werden. Mit Hilfe der übrigen Fixierungsmittel

wurden stets klare Bilder mit deutlich erkennbarer Farbreaktion erzielt. In den weiteren Versuchen wurden vorwiegend Äthylalkohol und Sublimatalkohol verwendet. Die Hydrolyse wurde stets in n-HCl vorgenommen bei einer Temperatur von 58—60° C während einer Dauer von 8—10 min. Danach erfolgte das Einstellen in die fuchsinschweflige Säure, die nach den Vorschriften von Feulgen hergestellt war. Die Präparate blieben 3—4 Std in diesem Reagens und wurden mindestens eine Stunde lang in SO_2-haltigem Wasser, darauf kurz in Leitungswasser gespült. — Für die zarte Färbung erwies sich die Einbettung in Glycerin als die beste. Beobachtet wurde mit einem Zeiß Apochromat (Öl-Immersion 120, num. Ap. 1.30) und Okularen 10× und 15×. Als Lichtquelle diente eine Niedervolt-Mikroskopierleuchte. Durch Verwendung eines grünen Farbfilters konnte die Beobachtung wesentlich erleichtert werden. Eine Plasmagegenfärbung wurde zunächst vermieden, um das Bild nicht zu komplizieren, später mit Alizarinviridin mit Erfolg vorgenommen. — Kontrollpräparate ohne vorangegangene Hydrolyse blieben nur eine Stunde im Feulgen-Reagens, da bei längerem Aufenthalt hydrolytische Spaltungen am Objekt eintreten können. Die Nuclealreaktion verlief hier stets negativ.

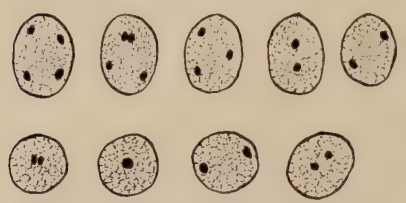


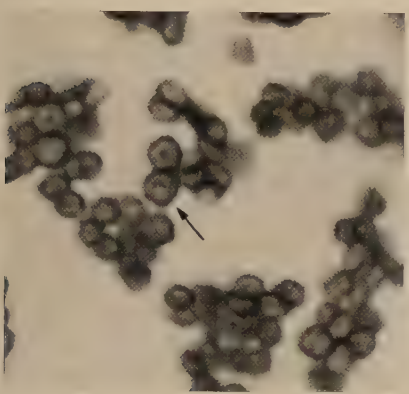
Abb. 1. *Azotobacter chroococcum*, gezeichnet nach Feulgen-Präparat, obere Gruppe: Zellen aus einer 18 Std alten Kultur, untere Gruppe: Zellen aus einer 3 Wochen alten Kultur.

Mit der beschriebenen Methodik konnte in den *Azotobacter*-Zellen Thymonucleinsäure in streng lokalisierter Form nachgewiesen werden. Die feulgenpositiven Orte traten als mehr oder weniger runde Gebilde in Erscheinung und zeigten hinsichtlich ihrer Zahl und Lage bemerkenswerte Unterschiede. Zunächst wurde Material aus 12—18 Std alten Kulturen untersucht. Die Zellen sind in diesem Alter allgemein oval bis stäbchenförmig und befinden sich in reger Teilung. In den ovalen Zellen konnten meist 4 nuclealpositive Körperchen beobachtet werden, nur in wenigen Fällen waren es deren 2 oder 3. Ihre Lage innerhalb der Zelle ist aus Abb. 1 ersichtlich. Bei den stäbchenförmigen Zellen traten ebenfalls regelmäßig 4 dieser Gebilde auf, doch konnten zuweilen auch 6, ganz selten 5 gezählt werden.

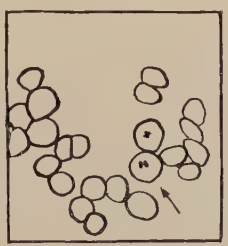
Teilungsstadien zeigten folgendes: bei soeben erkennbarer Einschnürung der Mutterzelle sind die 4 Körperchen zu je 2 auf die beiden Zellhälften verteilt. Ist die Teilung mehr oder weniger vollzogen, dann lassen sich auf Grund der Nucleoide 3 Formen unterscheiden: a) Tochterzellen mit je 2, b) je eine mit 2 und 4, c) beide mit je 4 nuclealpositiven Körperchen. Das Material aus etwa 3 Wochen alten Kulturen enthält meist kugelrunde Zellen. In ihnen konnten allgemein 2 feulgenpositive Gebilde nachgewiesen werden, die entweder im Zentrum eng nebeneinander lagen oder in der in Abb. 1 unten dargestellten Weise angeordnet waren. Daneben wurden zahlreiche Zellen mit nur einem einzigen nuclealpositiven Körper gefunden.

Für die Untersuchung der Involutionsformen von *Azotobacter* auf ihre feulgenpositive Substanz wurde Material aus Kolonien verwendet, das

24 Std bei 27° C auf einem Nährboden mit 5% Magnesiumsulfat (oder 1% Lithiumchlorid bzw. Rubidiumchlorid) herangezogen war. Diese abnormen Zellen enthielten vorwiegend 6 nuclealpositive Körperchen, doch wurden auch 4 und 2 je Zelle häufig gefunden, dagegen nur selten 5 oder 3. — Für die weitere Untersuchung dieser Gebilde wurde die Methode von Robinow (1944, 1946) herangezogen. Die Zellen wurden hier zunächst mit einer n-Salzsäure bei 60° C vorbehandelt, dann nach Giemsa 45 min gefärbt. Ein Vergleich der nach Feulgen und nach Robinow hergestellten Präparate ergab eine gute Übereinstimmung. In letzteren konnten die Körnchen deutlich als kreisrunde oder



a



b

Abb. 2*a*: *Azotobacter chroococcum*, gefärbt nach Robinow zur Darstellung der Nucleoide. Hellfeldaufnahme. Vergr. 1350×. 2*b*: Zeichnung dazu.

länglich-ovale Gebilde erkannt werden (Abb. 2). Nimmt man an, daß dieser Unterschied dadurch zustande kommt, daß man die Körnchen einmal von oben, das andere Mal von der Seite sieht, so handelt es sich hier um linsenförmige Gebilde. Dies kommt besonders deutlich bei den paarweise aneinanderliegenden Körnchen zum Ausdruck.

Um näheren Aufschluß über die Zahlenverhältnisse dieser Nucleoide zu erhalten, wurden etwa 2000 wahllos aus verschiedenen Präparaten herausgegriffene Zellen auf die Zahl ihrer feulgenpositiven Körperchen genauestens untersucht. Eine Gliederung erfolgte nach dem Alter der Kolonien, aus denen das Material für die einzelnen Präparate entnommen wurde. Das Ergebnis ist in Tab. 1 wiedergegeben. Die Werte oberhalb des Striches beziehen sich auf die Zählung an Feulgen-Präparaten, unterhalb auf die der Robinow-Präparate. Rechts neben dem Strich der Mittelwert.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Ergebnisse der beiden Darstellungsmethoden weitgehend übereinstimmen. Nur in der ersten senkrechten Reihe treten zwischen beiden größere Differenzen auf, die wahrscheinlich dadurch zustande kommen, daß nach der distinkten Robinow-Färbung dort meist 2 Körperchen vorhanden sind, wo nach der

Feulgen-Färbung nur ein einziges zu erkennen ist. Ferner ist auffällig, daß nur der 2- und 4-Zahl eine größere Bedeutung zukommt. In den Zellen junger Kulturen (14—18 Std) sind meist 4 Nucleoide, in den älteren aus 3 Wochen alten Kolonien regelmäßig nur 2 zu beobachten.

Tabelle 1. *Häufigkeit der Nucleoide in verschieden alten Azotobacter-Zellen in %, ermittelt nach* Feulgen- *und* Robinow-*Präparaten.*

Alter d. Kol.	1	2	3	4	5	6 Nucl.
16 Std	$\frac{0}{0}$ 0	$\frac{38}{36}$ 37	$\frac{4}{2}$ 3	$\frac{57}{55}$ 56	$\frac{0}{2}$ 1	$\frac{1}{5}$ 3
48 Std	$\frac{12}{2}$ 7	$\frac{40}{48}$ 44	$\frac{4}{4}$ 4	$\frac{42}{42}$ 42	$\frac{0}{1}$ 0,5	$\frac{2}{3}$ 2,5
3 Tage	$\frac{12}{0}$ 6	$\frac{58}{54}$ 56	$\frac{7}{8}$ 7,5	$\frac{20}{32}$ 26	$\frac{1}{3}$ 2	$\frac{2}{3}$ 2,5
3 Wochen . . .	$\frac{25}{19}$ 22	$\frac{79}{72}$ 70,5	$\frac{5}{3}$ 4	$\frac{1}{6}$ 3,5	$\frac{0}{0}$ 0	$\frac{0}{0}$ 0

Die Teilungsstadien wurden in diese Zählungen nicht mit aufgenommen. Wie beschrieben, können bei diesen hinsichtlich der Nucleoide 3 verschiedene Formen resultieren (siehe oben). Die Häufigkeit ihres Auftretens wurde aus weiteren Zählungen ermittelt, deren Ergebnisse Tab. 2 wiedergibt. Rund 0,6% dieser Zellen wichen durch ein Nucleoidverhältnis von 1:3 von den angegebenen Formen ab und wurden nicht mit in die Tabelle aufgenommen.

Tabelle 2. *Die Häufigkeit verschiedener Teilungsformen hinsichtlich der Nucleoide. a: Tochterzellen mit je zwei Nucleoiden, b: je eine mit zwei und vier, c: beide Tochterzellen mit vier Nucleoiden.*

Form	12 Std	24 Std	36 Std
a (2/2)	35	51	82
b (2/4)	44	33	18
c (4/4)	21	16	0

Das Vorhandensein von Paarlingen dieser Nucleoide weist darauf hin, daß es sich hier um ein echtes Duplikantensystem handelt (Strugger 1950), d. h. die Nucleoide stellen identisch reduplikable Struktureinheiten dar. Das Auftreten bestimmter Anzahlen von Nucleoiden scheint mit verschiedenen Stufen eines Entwicklungszyklus' zusammenzuhängen. So konnte Piekarski (1937) an *Paratyphus-* und *Coli*-Bakterien primäre und sekundäre Formen unterscheiden. Aus jungen Kulturen von frischen Agarplatten erhielt er Zellen mit regelmäßig 2 Nucleoiden, in älteren dagegen die sekundären Formen mit nur einem Nucleoid. Im

weiteren Sinne lassen sich diese Verhältnisse auch auf *Azotobacter* übertragen. Dabei wären als primäre Formen die jungen Zellen mit 4 Nucleoiden anzusprechen, als sekundäre die älteren mit zweien.

Da es von Interesse war, die Einwirkung caryoklastischer Gifte auf *Azotobacter* zu studieren, wurden Versuche mit Colchicin durchgeführt, das dem Ashby-Nährboden in verschiedener Konzentration (1:200; 1:400; 1:600; 1:800; 1:1000; 1:2000 usf. bis 1:10000) beigemischt wurde. Die Plattenkulturen wurden bei 28° C 24 Std bebrütet. Weder die Zellform noch die Zellteilung wurden beeinflußt. Auch die nach Feulgen und Robinow hergestellten Präparate ließen keinen Einfluß auf die Nucleoide gegenüber Kontrollkulturen erkennen. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß eine mitose-ähnliche Teilung der Nucleoide bei *Azotobacter* nicht vorkommt.

Weitere färberische Untersuchungen ergaben, daß besonders in älteren Zellen aus etwa 18 Std alten Kulturen zahlreiche Körnchen vorhanden sind. Diese ließen sich besonders gut mit sauren Farbstoffen färben, wie z. B. mit Säurefuchsin nach Altmann. Mit zunehmendem Alter der Zellen werden diese Körnchen zahlreicher und legen sich mehr der Membran an, bis sie schließlich eine einheitliche Schicht bilden. Dieser Zustand ist erreicht, sobald die Kolonie sich tief braunschwarz verfärbt hat, also nach etwa 6—15 Tagen. Eine Anfärbung ist dann weder mit basischen noch mit sauren Farbstoffen zu erzielen. — Da bereits Rippel u. Ludwig (1925) durch Kulturversuche zeigen konnten, daß die Bräunung der *Azotobacter*-Kolonien wahrscheinlich auf Melaninbildung beruht, lag es nahe, in diesen Strukturen die cytologische Grundlage dieser Erscheinung zu vermuten. Einen spezifischen mikrochemischen Nachweis gibt es allerdings nicht; die von Ries (1938) angegebenen Reaktionen zum Nachweis dieses Pigmentes verliefen bei einem Untersuchungsmaterial aus 3 Wochen alten schwarzbraunen Kulturen positiv.

Nachweis von Reduktionsorten.

Der Nachweis von Reduktionsorten innerhalb der Bakterienzelle hat für die Nucleoidfrage insofern Bedeutung erlangt, als nach den Beobachtungen von Bielig, Kausche u. Haardick (1949) die Lokalisation der reduzierenden Systeme in Beziehung stehen soll zu den Bezirken höherer Nucleinsäurekonzentration (Wallhäusser 1950, 1951, 1952).

Um die eigenen Versuche methodisch einwandfrei durchzuführen, wurden zunächst die Untersuchungen von Bielig und Mitarb. wiederholt und noch auf andere Bakterien ausgedehnt. Die Ergebnisse der genannten Autoren konnten bestätigt werden. Allein bei *Sarcina*-Arten trat niemals eine Reduktion des Tetrazoliums auf. An *Azotobacter* waren diese Versuche nicht in der gleichen Weise durchzuführen, da das Wachstum dieses Bakteriums in flüssigen Nährmedien nur sehr gering war. Da ferner das Tetrazolium bei Zugabe zum Nährboden während der Sterilisation bereits reduziert wird, wurde im folgenden so vorgegangen, daß im

vollen Wachstum befindliche Kolonien auf der Petri-Schale mit 1 bzw. 2 cm³ der Tetrazoliumlösung übergossen wurden. Eine Reaktion auf unbeimpften Agarplatten trat nicht ein.

Die Beobachtungen ergaben, daß die Reduktion nur von wachsenden Zellen vollzogen werden kann. Ob sie innerhalb der Bakterienzelle an bestimmte präformierte Strukturen gebunden ist, konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Doch scheint eine Beziehung zwischen den Nucleoiden und den Reduktionsorten nicht zu bestehen, da die Formazankugeln in ungleichmäßiger Zahl, Größe und Anordnung auftreten im Gegensatz zu dem streng gesetzmäßigen Auftreten der Nucleoide.

Bestimmung des isoelektrischen Punktes.

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde mit Hilfe der Säurefuchsin-Toluidinblau-Methode (Drawert 1937) sowie nach der Acridinorange-Methode (Strugger 1940, Nordmeyer 1947) durchgeführt. Die verwendeten Phosphat-Pufferlösungen wurden mit dem Lautenschläger-Ionometer (Chinhydron-Elektrode) gemessen. Auf beiden Wegen wurden übereinstimmende Ergebnisse erzielt. Für das Cytoplasma konnte ein I.E.P.$_M$ von p_H 2,7 ermittelt werden. Schwankungen im Bereich von p_H 2,6—3,1 standen offensichtlich mit dem Alter der Zellen im Zusammenhang, und zwar schien eine geringe Verschiebung der Lage des I.E.P.$_M$ mit zunehmendem Alter von p_H 2,7 nach 3,1 stattzufinden.

Die Bestimmung des I.E.P.$_M$ der körnigen Strukturelemente in der *Azotobacter*zelle erfolgte mit Hilfe der Säurefuchsin-Toluidinblau-Methode. Eine exakte Unterscheidung zwischen Nucleoiden und anderen körnigen Gebilden war hier nicht möglich, doch konnten nach den bisherigen Erfahrungen die in charakteristischer Paarlingform auftretenden Körperchen im Zentrum der Zelle mit einiger Sicherheit als Nucleoide angesprochen werden. Ihre Anfärbung gelang mit Säurefuchsin bei p_H 2,0—2,8 der Farblösung, mit Toluidinblau ab p_H 3,3, so daß ein I.E.P.$_M$ um 3,1 angenommen werden kann. Vergleichende Untersuchungen mittels der Acridinorange-Methode ergaben einen Umschlagsbereich zwischen p_H 3,1 und 3,3. Für die übrigen Körnchen der *Azotobacter*zelle konnte ein I.E.P.$_M$ zwischen p_H 3,1 und 3,5 ermittelt werden. In diesem Falle war die Acridinorange-Methode nicht anwendbar, da die wahrscheinlich aus Melanin bestehenden Granula sich als fluorescenzlöschend erwiesen.

Die Acridinorange-Vitalfluorochromierung.

Eine eingehende Erforschung der intravitalen Zellstruktur von *Azotobacter* wurde mangels geeigneter Methodik bisher noch nicht vorgenommen, denn bei der Kleinheit des Objektes ist bei dem gebräuchlichen

Verfahren des hängenden Tropfens nur wenig mehr als die Umrißform der Zellen wahrzunehmen. Für eine genauere Untersuchung ist daher eine Vitalfärbung erforderlich. — Der von Strugger (1940) aufgezeigte Weg über die Vitalfärbung der Metaphytenzelle mit Acridinorange wurde von Strugger u. Hilbrich (1942) erstmalig auf die Bakterienzelle übertragen. Die Fluorochromierung erwies sich den bisherigen Verfahren weitaus überlegen. Die Vorteile bestehen im wesentlichen darin, daß 1. das Acridinorange eine hohe Affinität zu den lebenden Eiweißkörpern des Protoplasmas besitzt, die eine schnelle und vollkommene Anfärbung der Zelle gewährleistet, 2. die fluorescenzoptische Nachweisbarkeit sehr empfindlich ist, so daß man mit geringen Konzentrationen erfolgreich arbeiten kann, und 3. eine echte Vitalfärbung erzielt wird, da alle toten Zellen infolge des Konzentrationseffektes deutlich von den lebenden zu unterscheiden sind.

Für die folgenden Untersuchungen an *Azotobacter* erschien es notwendig, zunächst die toxischen Wirkungen des Acridinorange festzustellen. Ein Ashby-Agar wurde zu diesem Zweck mit Acridinorange in verschiedener Konzentration versehen, sterilisiert und mit vorkultivierten Stämmen beimpft. Nach 24 Std bei 27° C im Thermostaten konnte festgestellt werden, daß bis zu Konzentrationen von 1:500 kein Wachstum erfolgt war und bis zu 1:1200 nur einzelne Kolonien angingen, die sich langsam weiterentwickelten. Von etwa 1:1500 ab war das Wachstum normal. Unterschiede in der Form der Kolonien von acridinorangehaltigen und acridinorangefreien Nährböden bestanden nicht, in den Zellen dieser Kulturen konnte eine intravitale Speicherung des Farbstoffes im Fluorescenzmikroskop an der Grünfluorescenz des Plasmas beobachtet werden.

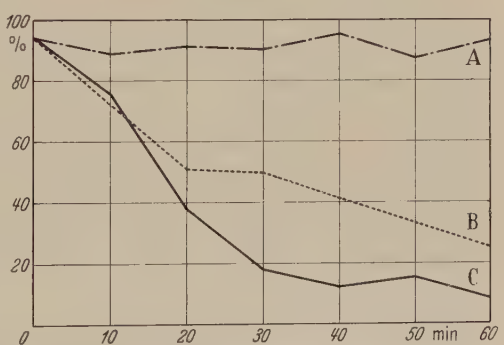


Abb. 3. Der photodynamische Effekt an fluorochromierten *Azotobacter*-Zellen (Suspensionen in Acridinorange 1 : 5000, Leitungswasser). Ordinate: Prozentsatz der lebenden Zellen, Abszisse: Versuchsdauer in Minuten. A: im Dunkeln, B: Bestrahlung mit Sonnenlicht, C: Bestrahlung mit Blaulicht.

Für die weiteren Untersuchungen wurde das *Azotobacter*-Material stets in Leitungswasser suspendiert, das sich als günstigstes Milieu erwies.

Das Auftreten eines photodynamischen Effektes an fluorochromierten Zellen konnte in zahlreichen Experimenten beobachtet werden, deren Ergebnisse zusammenfassend in Abb. 3 dargestellt werden. — Neben der fluorescenzmikroskopischen Kontrolle auf den Lebenszustand der Zellen

wurden parallel hierzu Plattenkulturen angelegt, die ergaben, daß an Zellen aus fluorochromierten Suspensionen nach 3 min Bestrahlung mit Blaulicht Wachstumsverzögerungen auftraten. Die Kolonien blieben zunächst sehr klein und glasig durchsichtig, während die Kontrollen bereits mehrere Millimeter Durchmesser erreicht hatten und milchigweiß erschienen. Nach 3 Tagen war diese Wachstumsverzögerung aber überwunden, die Kulturen unterschieden sich nicht mehr von den Kontrollen. Nach 15 min Bestrahlung wuchsen auf der Platte nur einzelne Kolonien an, die sich langsam weiterentwickelten.

Für die Untersuchung lebender und toter Bakterienzellen mit Hilfe der Acridinorange-Vitalfluorochromierung sind 3 Voraussetzungen von ausschlaggebender Bedeutung (Strugger 1949): 1. der Farbstoff darf keine toxischen Wirkungen auf das zu untersuchende Material ausüben, 2. bei der Anfärbung muß stets ein Farbstoffüberschuß vorhanden sein, 3. bei der Beurteilung der Zellen darf nur die Plasmafluorescenz ausgewertet werden.

Ad 1. Die Wirkung des Acridinorange auf *Azotobacter* wurde bereits in den vorangegangenen Versuchen dargelegt. Demnach ist mit einer Schädigung der Zellen durch den Farbstoff bei einer Konzentration von 1:10000 in Leitungswasser und einer fluorescenzmikroskopischen Beobachtungsdauer von 3 min nicht zu rechnen.

Ad 2. Ein Farbstoffüberschuß ist notwendig, um eine völlige Durchfluorochromierung des Materials zu gewährleisten. Dabei speichern tote Zellen die 14fache Menge an Acridinorange wie lebende, wie Kölbel (1947) durch quantitativ-colorimetrische Messungen an Hefezellen zeigen konnte. — Bei den häufig sehr stark ausgebildeten Schleimhüllen von *Azotobacter* ist dies besonders zu beachten, da gerade hierdurch große Mengen des Farbstoffes gebunden werden. Als zureichend erwies sich eine Anfärbung, bei der geringe Mengen des Materials mit der Öse in 1—2 ml einer Acridinorangelösung 1:10000 — vergleichsweise auch 1:5000 — gebracht wurden.

Ad 3. Die Beurteilung der Plasmafluorescenz stößt bei *Azotobacter* im allgemeinen bei günstigen optischen Verhältnissen auf keine Schwierigkeit. Sie ist bei lebenden Zellen normalerweise grasgrün, eine Verdeckung durch andere fluorescierende Inhaltskörperchen konnte niemals beobachtet werden; dagegen kann die rot fluorescierende Schleimhülle die Plasmafluorescenz leicht überdecken, so daß diese jetzt gelblich oder graugrün erscheint. In jedem Falle aber ist es möglich, diese von dem kupferrot fluorescierenden Protoplasma toter Zellen eindeutig zu unterscheiden.

Zum Beweise der Vitalität der plasmatisch grün fluorescierenden *Azotobacter*-Zellen wurden Mikrokulturen angelegt. Die Beobachtungen bestätigten aufs neue, daß nur die plasmatisch grün fluorescierenden

Bakterienzellen zu einer Vermehrung fähig sind. Gelbgrün leuchtende Formen sind dazu nicht imstande. Ferner konnte festgestellt werden, daß die Teilung um so später einsetzt, je älter das Ausgangsmaterial war. — Auch in Kulturversuchen zeigte sich, daß von den plasmatisch grün fluorescierenden Zellen etwa 89% zu einer Kolonie auswuchsen, von den gelblichen oder kupferroten dagegen keine. — Durch Modifikation des Nährbodens konnte die Fluorescenzfarbe niemals beeinflußt werden.

Für die Beobachtung der vitalen Plasmastruktur wurde die Fluorochromierung mit einer Acridinorange-Lösung 1:20000 bis 1:80000 vorgenommen. Die Untersuchung erfolgte entweder in der Farblösung oder in einem Tropfen Paraffinum liquidum unter einem möglichst dünnen Deckglas, das durch Deckglassplitter abgestützt wurde, um eine Beschädigung der Bakterien durch Druck zu vermeiden.

Junge *Azotobacter*-Zellen aus einer 12—16 Std alten Kultur von ovaler bis stäbchenförmiger Gestalt zeigten fluorescenzoptisch ein grasgrünes, völlig homogenes Cytoplasma. Die Membran war meist als ein zartes Häutchen von rötlicher Fluorescenz soeben zu sehen. — Zellen aus einer 24 Std alten Kultur zeigten folgendes Bild: eine mehr oder weniger dicke rot fluorescierende Membran (Schleimschicht) umgab die ovale bis kugelrunde *Azotobacter*-Zelle, das Cytoplasma erschien hier netzförmig und enthielt in der Mitte gelbgrün fluorescierende Körnchen. Unter diesen wurden auch zuweilen die Paarlinge beobachtet, die schon als charakteristisch für Nucleoide angegeben wurden. Die Prüfung der Zahlenverhältnisse dieser Gebilde ergab eine gute Übereinstimmung mit den oben angegebenen Beobachtungen. Da nun auch von Metaphytenzellkernen bekannt ist, daß thymonucleinsäurehaltige Bestandteile das Acridinorange verstärkt zu speichern vermögen und dies durch eine gelbgrüne Fluorescenz zu erkennen geben, so handelt es sich auch hier offenbar um die thymonucleinsäurehaltigen Nucleoide. Jedoch muß beachtet werden, daß auch Volutinkügelchen in gleicher Farbe auftreten können und in diesem Falle eine Unterscheidung von den Nucleoiden nicht möglich ist.

Zellen aus einer 2 Tage alten, weißgrauen Kolonie ließen folgendes erkennen: die Membran der Schleimhülle war gegenüber den vorhergehenden unverändert. Die netzförmige Struktur des Cytoplasmas trat noch deutlicher in Erscheinung; die Nucleoide waren gut zu erkennen. Außerdem traten, besonders zur Membran hin, einzelne dunkle, fluorescenzfreie Gebilde auf. Ein Vergleich im Hellfeld und mit fixierten Präparaten ergab, daß es sich hier einwandfrei um die Melaninkörnchen handelte. Das wurde noch deutlicher bei Zellen aus schwarzbraunen Kolonien (4—6 Tage alt). Die aus einzelnen Melaninkörnchen zusammengesetzte Rindenschicht war hier bereits ausgebildet und löschte die Fluorescenz vollständig. Von außen nach innen beobachtete man nun 3 Zonen in der *Azotobacter*-Zelle: 1. die kupferrot fluorescierende Membran, 2. die fluores-

cenzfreie, melaninhaltige Rindenschicht und 3. das grasgrün fluorescierende Cytoplasma (Nucleoide waren hier nicht zu erkennen).

Das Material aus bereits etwas eingetrockneten schwarzbraunen Kolonien (3 Wochen alt) zeigt nach Acridinorange-Fluorochromierung auffällig kleine, grasgrün leuchtende Zellen. Eine vergleichende Beobachtung im Hellfeld lehrt, daß die Zellen ½ bis doppelt so groß sind, als sie im Fluorescenzmikroskop erscheinen. Nur selten ist eine Membranfluorescenz wahrnehmbar. Diese Tatsache mag dadurch erklärt werden, daß im fluorescenzmikroskopischen Bild nur der zentrale Cytoplasma-Anteil dargestellt wird, die Rindenschicht als fluorescenzlöschend nicht sichtbar ist, dagegen im Hellfeld leicht beobachtet werden kann. Die Membran und die Schleimhülle sind in den meisten Fällen nur als ganz dünner, rot fluorescierender Saum sichtbar oder können überhaupt nicht mehr wahrgenommen werden. Die Erklärung liegt wahrscheinlich darin, daß die Schleimschicht aus leicht quellbaren Kohlenhydraten besteht (nach Duguid, 1948, zu 90% Glucose und 3—4% Uronsäuren), so daß sie beim Eintrocknen stark zusammenschrumpft und ihr Nachweis nicht immer mehr möglich ist.

Involutionsformen, die bei 35° C im Thermostaten gezüchtet wurden, zeigten eine noch gröbere wabige Struktur des grasgrün fluorescierenden Cytoplasmas, das außerdem einige größere fluorescenzfreie Vacuolen erkennen ließ. Die Schleimhülle war nur soeben durch orangerote Fluorescenz angedeutet.

Untersuchungen mit dem Phasenkontrastmikroskop.

Eine weitere Möglichkeit zur Lebendbeobachtung von Bakterien besteht im Phasenkontrastverfahren. Nach den bisher vorliegenden Mitteilungen von Knöll (1944) und Winkler (1951) erscheint gesichert, daß die Nucleinsäure am Zustandekommen des Phasenkontrastbildes der Bakterien wesentlich beteiligt ist. Damit ist eine Möglichkeit gegeben, die Nucleoide intravital unter den physiologisch günstigsten Bedingungen zu untersuchen, d. h. ohne Anwendung färberischer oder anderer Darstellungsmethoden.

Die folgenden Beobachtungen wurden mit dem Mikroskop Ortholux und einer Phasenkontrasteinrichtung mit dem Heineschen Kondensor durchgeführt (E. Leitz, Wetzlar). Als Objektiv diente die apochromatische Ölimmersion Pv Apo Öl 90/1,15; als Okulare wurden solche mit 10- und 12facher Vergrößerung im Monokular und Binokular benutzt. Die eingebaute Lichtquelle bestand aus einer Niedervoltglühlampe (6 Volt 5 Ampere). Für die Immersion wurde das Immersionsöl der Firma Leitz verwendet (nD = 1,515), das zwischen Deckglas und Objektiv sowie zwischen Immersionskappe des Kondensors und Objektträger gebracht wurde. Bei allen Beobachtungen und Aufnahmen kam ein Grünfilter zur Anwendung. Eine sorgfältige Zentrierung wurde vor jeder Beobachtung mit Hilfe der Einstellupe vorgenommen.

Junge *Azotobacter*-Zellen aus 24 Std alten Kulturen zeigten einen gut erkennbaren netzförmigen Bau des Cytoplasmas und enthielten zahlreiche Körnchen in unregelmäßiger Zahl und Lagerung. Eine Differenzierung dieser Gebilde in Nucleoide, periphere Körnchen und Reservestoffkügelchen gelang nicht. Die Membran trat als ein mehr oder weniger dicker dunkelgrauer Saum in Erscheinung, Schleimhüllen konnten nicht beobachtet werden. Die einzelnen Zellen waren stets von einem hellen Diffraktionsraum umgeben.

Involutionsformen, die einer 24 Std alten, bei 35° C gewachsenen Kultur entnommen wurden, zeigten einen grobwabigeren Bau des Cytoplasmas als die normalen Zellen und enthielten eine bis mehrere große Vacuolen. Nucleoide konnten hier nicht mit Sicherheit erkannt werden.

Azotobacter-Zellen aus einer etwa 3 Tage alten schwach braunen Kultur ließen deutlich eine Membran als schmalen schwarzen Saum erkennen und enthielten ein feinwabiges oder homogenes Cytoplasma. An Einschlußkörperchen konnten die grauschwarz erscheinenden peripheren Körnchen von den meist zentral gelegenen tiefschwarz erscheinenden Nucleoidpaarlingen unterschieden werden. Bei sorgfältiger Durchmusterung der einzelnen Zellen ergab sich, daß meist 2 Paare von Nucleoiden vorhanden waren, die häufig in verschiedenen optischen Ebenen lagen.

Alte *Azotobacter*-Zellen aus 3 Wochen alten Kulturen zeigten im Phasenkontrast die Membran in Form einer dicken schwarzen Rinde, das Cytoplasma war völlig homogen und enthielt 1 oder 2 schwarze Körnchen, die entweder einzeln als kreisrunde Gebilde oder in der bekannten Paarlingsform auftraten (Abb. 4)[1].

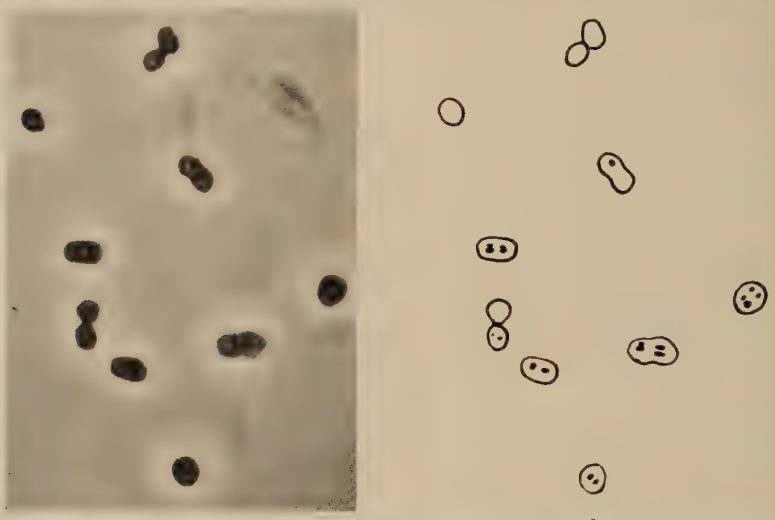
Ein Vergleich dieser Bilder mit solchen nach Feulgen und Robinow-Präparaten ergab hinsichtlich Form und Lage dieser Körnchen eine völlige Übereinstimmung mit den Nucleoiden. Die Zahlenverhältnisse dieser Gebilde, wie sie an 124 Zellen nach Protokollzeichnungen der Phasenkontrast-Vitalbeobachtung ermittelt wurden, entsprachen den in Tab. 1 angegebenen ziemlich genau. Eine vergleichende Darstellung dieser Ergebnisse zeigt Tab. 3.

Demnach können die in alten *Azotobacter*-Zellen im Phasenkontrast tiefschwarz erscheinenden Körperchen mit großer Sicherheit als Nucleoide angesprochen werden. Diese Annahme bestätigt ferner auch ihr Verhalten bei der Zellteilung, wie es in den folgenden Mikrokulturversuchen im Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden konnte.

---

[1] A. Krieg (Naturwissenschaften, 41. Bd., S. 147) veröffentlichte während der Drucklegung dieser Arbeit eine kurze Notiz über mikroskopische Vitaluntersuchungen an *Azotobacter*-Zellen. Er konnte bei der phasenkontrastmikroskopischen Analyse Strukturen beobachten, welche den hier als Nucleoide erkannten Gebilden gleich sind. Er läßt die Frage nach der Nucleoidnatur dieser Gebilde noch offen. Mit Acridinorange konnte Krieg in vivo ein nucleoidähnliches Gebilde herausfärben.

Bei diesen Untersuchungen wurde als Impfmaterial nur solches aus 1—3 Wochen alten Kulturen verwendet, da allein hier die Zellen das beschriebene übersichtliche Bild zeigen. Technische Schwierigkeiten ergaben sich anfangs dadurch, daß dieses Material eine verhältnismäßig



a *b*

Abb. 4*a*: *Azotobacter chroococcum* aus drei Wochen alter Kultur. Phasenkontrastaufnahme (Apo Öl 90 ×, Okular 10 ×, Grünfilter). Vergr. 1350 ×. 4*b*: Zeichnung dazu.

lange Zeit braucht, bis Wachstum und Vermehrung einsetzen. Daher wurden die Präparate mindestens 12 Std vor der mikroskopischen Beobachtung hergestellt und während dieser Zeit im Thermostaten bei 27° C aufbewahrt.

Tabelle 3. *Häufigkeit der Nucleoide bei Azotobacter-Zellen aus 3 Wochen alten Kulturen, ermittelt nach* Feulgen-*Präparaten und nach Vitalbeobachtung im Phasenkontrastmikroskop, Angaben in %.*

Anzahl der Nucleoide	Feulgen-Präparate	Phasenkontrast
1	22	17
2	70,5	75
3	4	2
4	3,5	6
5	0	0
6	0	0

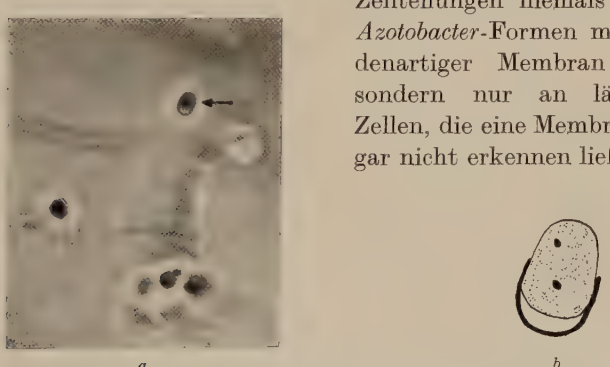
Die Umbildung einer alten *Azotobacter*-Zelle in eine teilungsbereite Form konnte in einem einzigen Falle in ihrem ganzen Ablauf verfolgt werden. Das Material stammte aus einer 3 Wochen alten schwarzbraunen Kolonie, die beobachtete Zelle war kugelrund und mit dicker, rindenartiger Membran, das Cytoplasma homogen, mit 2 deutlich sichtbaren Nucleoiden.

Die ersten wahrnehmbaren Veränderungen bestanden in einer schwachen Streckung der Zelle zu einer ovalen Form. Bald darauf war an dem einen Pol eine kleine Plasma-Ausstülpung sichtbar, während am entgegengesetzten Pol das Cytoplasma sich von der dicken Membran ein wenig abhob. In den folgenden 2 Std blieb dieses Bild unverändert, bis



Abb. 5. Entwicklung einer alten *Azotobacter*-Zelle aus einer 20 Tage alten Kultur; Zeichnung nach einer Mikrokultur im Phasenkontrast.

dann plötzlich der gesamte Protoplast aus der Hülle schlüpfte, die nun im leeren Zustand eine kleine Öffnung deutlich erkennen ließ; die junge Zelle nahm alsbald eine länglich-ovale Form an, eine Teilung erfolgte jedoch während der nächsten 6 Std nicht. Der zeitliche Ablauf dieses Geschehens ist im einzelnen aus Abb. 5 ersichtlich. In den weiteren Beobachtungen konnten einzelne Phasen dieses Prozesses wiederholt festgestellt werden (Abb. 6). — Die Untersuchung ergab allgemein, daß Zellteilungen niemals an den alten *Azotobacter*-Formen mit dicker rindenartiger Membran stattfanden, sondern nur an länglich-ovalen Zellen, die eine Membran kaum oder gar nicht erkennen ließen.



a *b*

Abb. 6*a*: Ausschlüpfende *Azotobacter*-Zelle, Phasenkontrastaufnahme aus einer Mikrokultur. (Apo Öl 90 ×, Okular 10 ×, Grünfilter). 6*b*: Zeichnung dazu.

Der Vorgang selbst verlief derart, daß die Zelle sich zunächst ein wenig streckte, dann in der Mitte sich immer mehr einzuschnüren begann, bis schließlich die Tochterzellen vollständig voneinander getrennt waren. Das Verhalten der Nucleoide bei diesen Vorgängen war unterschiedlich. Im einfachsten Falle wurden sie gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt in der Weise, daß die Nucleoide mit beginnender

Einschnürung nach den Polen auseinanderwichen oder durch die Einschnürung selbst voneinander getrennt wurden. In anderen Fällen konnte festgestellt werden, daß die Verteilung der Nucleoide nicht immer gleichmäßig erfolgt. Die Mutterzelle enthielt einmal 4 schwarze Körnchen in zentraler Lage; die Einschnürung erfolgte dann derart, daß die untere Zelle 1, die obere 3 davon erhielt.

Die in der Abb. 7 wiedergegebenen Beobachtungsreihen zeigen außer der Zellteilung auch Nucleoidvermehrung. In allen 3 Fällen scheinen diese Vorgänge nicht unmittelbar im Zusammenhang zu stehen, doch

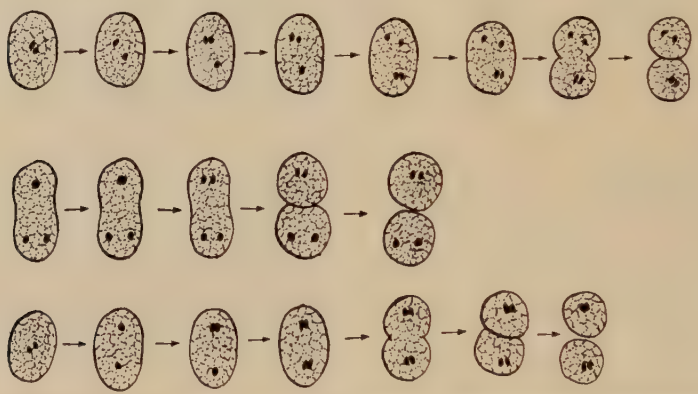


Abb. 7. Zellteilung und Nucleoidvermehrung bei *Azotobacter*; gezeichnet nach einer Mikrokultur im Phasenkontrast.

läßt sich genaueres darüber kaum aussagen, da eine Nucleoidvermehrung mit Sicherheit erst dann festgestellt werden kann, wenn die Paarlinge eine gewisse Distanz erreicht haben.

Die Beobachtungen ergeben, erstens daß die im positiven Phasenkontrast in alten *Azotobacter*-Zellen aus etwa 2—3 Wochen alten Kulturen tiefschwarz erscheinenden Körperchen hinsichtlich ihrer Form und Lage mit den feulgenpositiven Gebilden übereinstimmen. Zweitens zeigt ein Vergleich der Zahlenverhältnisse dieser Körperchen, wie sie nach phasenkontrastmikroskopischen Bildern einerseits und Feulgen- und Robinow-Präparaten andererseits ermittelt wurden, eine nahezu völlige Übereinstimmung. Zum dritten kann festgestellt werden, daß eine Vermehrung dieser Gebilde in Form einer einfachen Teilung vor sich geht; bei der Zellteilung werden sie mehr oder weniger gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. — Demnach stellen diese Nucleoide echte identisch reduplikable Struktureinheiten dar, denen sehr wahrscheinlich trotz ihrer im Verhältnis zur Zelle schon geringen Größe Kernfunktion zukommt. Aus all diesen Beobachtungen — insbesondere der Wirkungslosigkeit des Colchicins — geht jedoch hervor, daß keinerlei Anhalts-

punkte dafür vorliegen, die Nucleoide des *Azotobacter* als Chromosomen anzusprechen. Ob solche überhaupt bei Bakterien auftreten, wie es Delamater (1952) für *Bac. megaterium* u. a. fordert, ist heute noch umstritten (vgl. Jaag, 1953).

Zum Entwicklungszyklus von Azotobacter.

Wie die vorangegangenen Betrachtungen gezeigt haben, unterliegt die cytoplasmatische Struktur der *Azotobacter*-Zellen im Laufe des Wachstums mannigfachen Änderungen, die auf einen Entwicklungszyklus dieses Bakteriums schließen lassen. Krzemienievski (1908), Prazmowski (1912) sowie Löhnis u. Smith (1923) beschreiben einen großen Formwandel dieses Organismus', doch haben Niemeyer (1924), de Regel (1932), Wilke (1930) und Winogradski (1937) gezeigt, daß ein so weitgehender Pleomorphismus abgelehnt werden muß. Auch die Angaben von Maltschewski (1951) über die Dissoziation des *Azotobacter* konnten nicht bestätigt werden (Stolp u. Speyer, 1951).

Nach den Beobachtungen an zahlreichen Mikrokulturen und Präparaten von Kolonien jeglichen Alters, wie sie oben mitgeteilt wurden, ergibt sich eine Formenfolge des *Azotobacter*, die wie folgt beschrieben werden kann.

Junge Zellen haben eine länglich-ovale Form. Eine Schleimhülle ist bei ihnen noch nicht oder nur sehr schwach ausgebildet, das Cytoplasma ist völlig homogen und birgt meist 2 Paare von Nucleoiden, die den Polen der Zelle genähert liegen. Sobald eine Teilung durch beginnende Einschnürung in der Mitte des Individuums eingeleitet wird, erfolgt im allgemeinen auch die Reduplikation der Nucleoide. Nach vollzogener Teilung strecken sich die Zellen zunächst wieder zu Stäbchen, die etwa 3—4mal so lang wie breit sind. Dann setzt der Prozeß von neuem ein. — Tritt dagegen durch Erschöpfung des Nährbodens ein Altern der Zellen ein, so ist dies mit einer zunehmenden Pigmentbildung zu erkennen. Die Zellen enthalten jetzt meist nur 2 Nucleoide und nehmen im Laufe der weiteren Entwicklung immer mehr Kugelgestalt an unter gleichzeitiger Ausbildung einer starken Schleimhülle, die häufig die Kokken zu Tetraden oder Ketten zusammenhält. Die peripheren Körnchen ordnen sich zu einer rindenartigen Melaninschicht, mit deren vollständigen Ausbildung die Zellen ein Ruhestadium eingehen. — Die weitere Entwicklung geht derart vor sich, daß nach Überimpfen auf einen frischen Nährboden die starre Membran an einer Stelle aufreißt und eine junge Zelle ausschlüpft, die sich bald darauf zu teilen beginnt. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Krzemieniewski sowie Eisenstark u. Mitarb. (1950).

Die von Wilke (1930) erneut beschriebene Erscheinung des Löhnisschen Symplasmas bei *Azotobacter* konnte in den eigenen Untersuchungen niemals beobachtet werden. Nach diesen Autoren sollen die Zellen durch „Autolyse" ihre Individualität

zuweilen aufgeben und sich zu dichten Plasmamassen vereinigen. Wie die eigenen Untersuchungen — insbesondere die Vitalbeobachtungen — ergaben, werden die *Azotobacter*-Zellen allein durch eine überaus starke Schleimbildung zu diesen beschriebenen Massen zusammengehalten. Durch Einwirkung von Kaliumnitrat kann eine Verquellung und Verflüssigung der Schleimhüllen herbeigeführt werden (Strugger 1949), so daß nun die Zellen voneinander isoliert werden; dies läßt sich eindeutig an mit Acridinorange vitalgefärbtem Material im Fluorescenzmikroskop beobachten. Eine Aufgabe der Individualität der Zellen liegt also nicht vor. Da die *Azotobacter*-Zellen nun stets mit einer mehr oder weniger dicken Schleimhülle umgeben sind, sofern eine geeignete Kohlenstoffquelle im Nährboden vorhanden ist, bleibt es zunächst unverständlich, weshalb die Erscheinung der vermeintlichen Symplasmabildung nur in einem bestimmten Alter von etwa 80 Std — bei 27° C — auftritt. Bei sämtlichen Untersuchungen konnte nun immer wieder festgestellt werden, daß der von *Azotobacter* ausgeschiedene Schleim eine unterschiedliche Konsistenz aufweist, wie es sich leicht bei der Aufschwemmung des Materials in Leitungswasser beobachten ließ. Dabei konnte im allgemeinen eine gleichmäßige Verteilung der Zellen mühelos erreicht werden, nur bei Verwendung von 3—6 Tage alten Kolonien zeigte das Material häufig eine zähe, beinahe gummiartige Beschaffenheit, so daß die Herstellung einer Suspension oft nicht möglich war. — Nach all diesen Befunden kann die von Wilke beschriebene Erscheinung durch die Schleimbildung des *Azotobacter* erklärt werden. Eine Symplasmabildung liegt demnach nicht vor.

Zusammenfassung.

1. Die Nuclealreaktion nach Feulgen zeigte in den Zellen von *Azotobacter chroococcum* Beij. Thymonucleinsäure, lokalisiert in linsenförmigen Körperchen, die in gesetzmäßiger Zahl auftraten, 4 in jungen Zellen, 2 in älteren Stadien.

2. Intra vitam erschienen diese Nucleoide im Phasenkontrast tiefschwarz. Ihre Vermehrung, die in Mikrokultur verfolgt werden konnte, geschieht durch einfache Teilung. Vitalbeobachtung im Phasenkontrast ergab ferner, daß sie bei der Zellteilung in den meisten Fällen gleichmäßig auf die Tochterindividuen verteilt werden, ohne daß jedoch ein direkter Zusammenhang von Nucleoid- und Zellteilung festgestellt werden konnte.

3. Colchicin hatte auf die Vermehrung der Nucleoide keinen Einfluß.

4. Das Pigment, wahrscheinlich ein Melanin, findet sich in Form kleiner Körnchen innerhalb der Zellen und bildet später, bei der Schwarzbraunfärbung der Kolonien, mit der Membran eine periphere rindenartige Schicht.

5. Der Ort der Reduktion von Tetrazoliumchlorid steht in der *Azotobacter*-Zelle in keiner Beziehung zu den feulgenpositiven Bezirken.

6. Der I. E. P. des Cytoplasmas und einzelner Zellbestandteile ergab mittels der Acridinorange-Methode und der Säurefuchsin-Toluidinblau-Methode übereinstimmend ein $I.E.P._M$ für die Nucleoide bei p_H 3,1 und für die peripheren Körnchen bei p_H 3,3; beim Cytoplasma lag er bei p_H 2,7

mit Schwankungen von p_H 2,6—3,1, die mit dem Alter der Zellen im Zusammenhang standen.

7. Es werden die Bedingungen für einwandfreie Vitalfluorochromierung mit Acridinorange ermittelt. Auf acridinorangehaltigen Nährböden erfolgt bis zur Konzentration von 1 : 1600 normales Wachstum. Stärkere Konzentrationen lassen nur mehr einzelne Kolonien angehen, ab 1 : 500 unterbleibt das Wachstum völlig. — Ein photodynamischer Effekt an acridinorange-fluorochromierten Zellen trat allgemein nach 10 min Bestrahlung (Blaulicht und Sonnenlicht) ein, nach drei Minuten langer Bestrahlung erfolgten Wachstumsverzögerungen. Lebende und tote Zellen ließen sich mit Hilfe der Acridinorange-Fluorochromierung bei starkem Farbstoffüberschuß einwandfrei differenzieren. Beeinflussung der Anfärbung chemischer oder nährbodentechnischer Art konnte nicht beobachtet werden. Tote Zellen zeigen plasmatische Rot-Fluorescenz, lebende dagegen plasmatisch grüne, die durch eine stark entwickelte rot fluorescierende Schleimhülle etwas überdeckt werden, dann aber dennoch stets erkennbar bleibt.

8. Ein so weitgehender Formenwandel von *Azotobacter chroococcum* wie bisher beschrieben besteht nicht. Es lassen sich zwei Hauptformen unterscheiden: In jungen Kulturen länglich-ovale Zellen mit durchschnittlich vier Nucleoiden, in älteren schwarzbraunen Kolonien kugelige Zellen mit ausgeprägter peripherer Melaninschicht und zwei Nucleoiden. Bei der Keimung der alten Zellen auf frischem Nährsubstrat konnte Sprengung der Membran und Ausschlüpfen der Keimzelle in vivo beobachtet werden. Symplasmabildung im Sinne Löhnis konnte nicht bestätigt werden; ähnliche Erscheinungen erwiesen sich mit Hilfe der Acridinorange-Vitalfluorochromierung als Zellanhäufungen, die den Zusammenhalt und ihre scheinbar homogene Beschaffenheit einer ungemein starken Schleimbildung verdanken.

Literatur.

Beauverie, J.: C. r. Ass. Franc. Avanc. Sci. **49**, 361 (1925). — C. r. Soc. Biol. Paris **98**, 369 (1928). — Beijerinck, M. W.: Zbl. Bakter. II, **7**, 561 (1901). — Bielig, H. J., G. A. Kausche u. H. Haardick: Z. Naturforsch. **39**, 354 (1952). — Bonazzi, A.: Agr. Res. **4**, 225 (1915).

Delamater, E. D.: Mikroskopie (Wien) **7**, 358 (1952). — Delaporte, B.: Rev. gén. Bot. **51**, 615 (1939). — den Dooren de Jong, L. E.: Arch. Mikrobiol. **9**, 223 (1938). — Drawert, H.: Flora **131**, 341 (1937).

Eisenstark, A., u. Mitarb.: J. Bacter. **59**, 75 (1950).

Feulgen, R., u. H. Rossenbeck: Z. physiol. Chem. **135**, 203 (1924). — Jones, D. H.: Zbl. Bakter. II, **40**, 170 (1914).

Knöll, H.: Zeiß-Nachr. 5. Folge, S. 38. — Kölbel, H.: Z. Naturforsch. **2b**, 381 (1947). — Krzemienievski, S.: Anz. Akad. Wiss. Krakau, Math.-Nat. Klasse Reihe B, S. 929 (1908).

Löhnis, F., u. J. Smith: Zbl. Bakter. II, **51**, 376 (1920).

Maltschewski, N.: Naturwissenschaften **38**, 304 (1951). — Mencl, E.: Arch. Protistenkde. **22**, 1 (1911). — Milovidov, P. F.: Arch. Mikrobiol. **6**, 475 (1935).

Neumann, F.: Berl. tierärztl. Wschr. **1930**, 101. — Zbl. Bakter. **103**, 385 (1941). — Niemeyer, L.: Bot. Archiv **7**, 363 (1924). — Nordmeyer, N.: Zbl. Bakter. I, **152**, 54 (1947).

Petschenko, B.: Zbl. Bakter. II, **80**, 161 (1930). — Piekarski, G.: Arch. Mikrobiol. **8**, 428 (1937). — Erg. Hyg. **26**, 333 (1949). — Pietschmann, K.: Arch. Mikrobiol. **2**, 310 (1931). — Prazmowski, A.: Zbl. Bakter. II, **33**, 292 (1912).

Regel, S. de: Zbl. Bakter. II, **86**, 44 (1932). — Ries, E.: Grundriß der Histophysiologie, Leipzig. — Rippel, A., u. O. Ludwig: Zbl. Bakter. II, **64**, 161 (1925). — Robinow, C. F.: J. of Hyg. **43**, 413 (1944). — Add. in Dubos, The bacterial cell, Cambridge.

Schussnig, B.: Handb. d. Protophytenkunde. Jena: H. Fischer 1953. — Stolp, H., u. E. Speyer: Arch. Mikrobiol. **17**, 30 (1952). — Strugger, S.: Jena. Z. Naturwiss. **73**, 97 (1940). — Fluorescenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover 1949. — Arb.-Gem. f. Forsch. d. L. Nordrhein-Westf., 6. Sitzg. 1950. — Strugger, S., u. P. Hilbrich: Dtsch. tierärztl. Wschr. **1942**, 50.

Wallhäusser, K. H.: Naturwissenschaften **37**, 450 (1950); **38**, 237 (1951). — Wilke, F.: Bot. Arch. **30**, 307 (1930). — Winkler, A.: Z. Naturforsch. **6b**, 72 (1951). — Winogradski, S.: Soil Sci. **43**, 327 (1937).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 261—272 (1954).

(Aus dem Institut für Bakteriologie und Serologie der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig-Gliesmarode.)

Über die Wirkung von Agar und Polyvinylalkohol auf das Wachstum von Aspergillus niger.

Von

C. Wetter.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. Februar 1954.)

Kultiviert man *Aspergillus niger* in einer synthetischen oder einer natürlichen Nährlösung, so stellt man nach dem Beimpfen (Conidien mittels einer Platinöse) fest, daß sich der Pilz nicht in einer geschlossenen Myceldecke auf der Oberfläche, sondern inselartig (Abb. 1) oder auch ringförmig (Abb. 4 II) am Gefäßrande entwickelt. Pulkki (1933) beobachtete, daß ein Zusatz von 0,1% Agar zur Nährlösung ein wesentlich besseres Wachstum zur Folge hatte, und daß sich hierdurch in einer bestimmten Zeit eine Steigerung des Ertragsgewichtes um mehr als 100% erzielen ließ. Da nach Rippel (1936) eine Nähr- oder Wuchsstoffwirkung des Agars nicht für die Wachstumsförderung verantwortlich ist, fragt es sich, welcher physikalisch-chemischen Eigenschaft des zugesetzten Kolloids die Förderung zu verdanken ist. Da Agar ein lyophiles Linearkolloid ist, das beim Auflösen viscose Hydrosole bildet, liegt es nahe, an eine Erniedrigung der Oberflächenspannung oder eine Erhöhung der Viscosität durch den Kolloidzusatz zu denken. Diese beiden Größen sollen daher zunächst betrachtet werden.



Abb. 1. Wachstum von *Aspergillus niger* in saurer synthetischer Nährlösung nach 64 Std bei 30° C.

Ferner ist die Bedeutung des Verteilungszustandes der *Aspergillus niger*-Conidien für das Wachstum des Mycels zu erörtern. Damit ist auch die Grundlage zum Verständnis der Wirkung des Polyvinylalkohols auf das Wachstum gegeben. Polyvinylalkohol, ein synthetisches makromolekulares Produkt, war gewählt worden, — und dies war ein weiteres Ziel

[1] Vgl. Rippel (1936), S. 215 und 216, Abb. 1.

der vorliegenden Arbeit — um den stets mit Nährstoffen verunreinigten handelsüblichen Agar als wachstumsbeschleunigendes Mittel zu ersetzen.

Abschließend wird noch einmal quantitativ vergleichend die Wirkung der kolloiden Zusätze betrachtet werden.

Die Bedeutung der Oberflächenspannung.

Virtanen (1936, S. 489) bemerkt zu dem oben angeführten Versuch von Pulkki: „Zum Nachweis dafür, daß die Viscosität der Nährlösung nach dem oben erwähnten kleinen Agarzusatz nicht nennenswert verändert wird, diene der folgende, bei 30° C ausgeführte stalagmometrische Versuch:

Nährlösung ohne Agar 51 Tropfen
Nährlösung mit Agar 48 Tropfen."

Nun kann man aber mit einem Stalagmometer nur die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit messen und nicht die Viscosität, so daß in dem zitierten Satz von Virtanen Viscosität durch Oberflächenspannung ersetzt werden muß. Wie noch gezeigt wird, ändert sich bei Agarzusatz die Viscosität der Nährlösung erheblich.

Rippel, der ohne Kenntnis der Arbeit von Pulkki die Bildung einer geschlossenen Myceldecke sowie eine Beschleunigung des Wachstums von *Aspergillus niger* durch einen 0,1%igen Agarzusatz feststellte, sagt darüber (S. 216): „Diese Beobachtung an *Aspergillus* in Bierwürze zeigt die Bedeutung der Oberflächenspannung der Lösung[1]." Die Viscosität soll für den Pilz keine so große Rolle spielen (S. 225), „da dieser Pilz sich vermöge seines Luftmycels leicht auf der Oberfläche halten kann, sobald die Keimschläuche diese erreicht haben". Sie wird allerdings von Rippel zur Erklärung der Agarwirkung auf *Azotobacter* mit herangezogen. Die Vermutung Rippels, daß die Oberflächenspannung der Nährlösung durch den Agarzusatz erniedrigt würde und dadurch die günstige Wirkung erklärt werden könnte, trifft aber nach dem stalagmometrischen Versuch von Pulkki nicht zu.

Die Wirkung des Agarzusatzes auf die Oberflächenspannung (σ) einer Nährlösung wurde noch einmal nachgeprüft, wobei mit dem Tensiometer bei 20° C folgende Werte gemessen wurden:

Bierwürze	σ	Wasser
ohne Agar	40,6 dyn/cm	σ = 72,7 dyn/cm
mit 0,1% Agar	43,3 dyn/cm	

Also ist die Oberflächenspannung mit Agar noch etwas höher als ohne Agar und dessen Wirkung nicht durch Erniedrigung der Oberflächenspannung erklärbar.

In der Folge wurde stets mit einer synthetischen Nährlösung gearbeitet, weil darin keine kolloiden Substanzen enthalten sind, die das Wachstum des Pilzes beeinflussen könnten. Daß auch in synthetischer

[1] Ruge (1951, S. 120) hat bei der Besprechung des Agarversuches diese Ansicht übernommen.

Nährlösung[1] die — wie in Bierwürze — stark erniedrigte Oberflächenspannung sich durch Agarzusatz nicht wesentlich ändert, zeigen folgende Werte:

Synthetische Nährlösung ohne Agar . . . . . 45,5 dyn/cm
Synthetische Nährlösung mit 0,1% Agar . . . . . 44,0 dyn/cm

Nun wurden Versuche angestellt mit dem Ziel, eine geschlossene Myceldecke und eine Wachstumsförderung dadurch zu erreichen, daß die Oberflächenspannung der Nährlösung durch ein Netzmittel (Alkylsulfonat 1 : 10000) gesenkt wurde. Obwohl die Conidien in dieser Nährlösung benetzt wurden und untersanken, ließ sich keine Wachstumsbeschleunigung feststellen.

Die Rolle der Viscosität.

Nachdem erwiesen war, daß die Oberflächenspannung bei der Agarwirkung bedeutungslos ist, blieb noch die Viscosität zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden der synthetischen Nährlösung 0,05; 0,1 und 0,5% Agar zugesetzt und die Viscosität mit einem Höppler-Viscosimeter bestimmt. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, ist die Viscosität bei einer Konzentration von 0,05% Agar bereits geringfügig, bei 0,1% aber sehr stark gegenüber der Kontrolle erhöht.

Tabelle 1. *Erhöhung der Viscosität durch Agar-Zusatz.*

Synthetische Nährlösung	Viscosität in Centipoise	Mycel-Wachstum
ohne Agar	1,216	Inseln
0,05% Agar	1,416	Decke
0,10% Agar	17,510	Decke
0,50% Agar	Gel	Decke

Aus diesem Versuchsergebnis kann geschlossen werden, daß die Viscositätserhöhung, also die größere Zähigkeit der Nährlösung mit 0,1% Agar, für die fördernde Wirkung verantwortlich ist.

[1] *Aspergillus niger* (Mulder-Stamm) wurde in 300 ml Erlenmeyer-Kolben aus Jenaer Glas bei 30° C in folgender Nährlösung kultiviert:

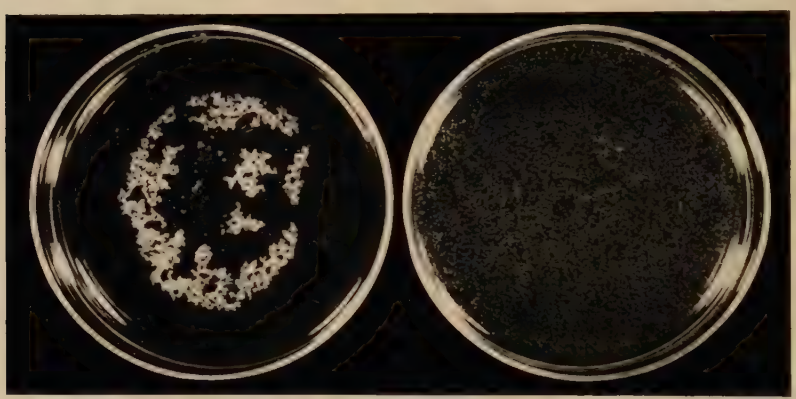
Makronährstoffe		Mikronährstoffe	
Glucose	50,0 g	$FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$	3,0 mg
KNO_3	5,0 g	$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	2,0 mg
$NaH_2PO_4 \cdot 12\,H_2O$	0,6 g	$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$	0,6 mg
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	1,0 g	$Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	0,5 mg
Aqua dest. aufgefüllt zu	1000,0 ml	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,3 mg

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurden die Mycelien bei 100° C im Trockenschrank 24 Std lang getrocknet. Bei den Angaben der Trockengewichte handelt es sich stets um Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

Herrn Dr. E. G. Mulder, Groningen, danke ich für die freundliche Überlassung seines Pilzstammes.

Die Bedeutung der Conidienverteilung.

Zum Verständnis der Wirkung des Agars durch Viscositätserhöhung der Nährlösung ist es notwendig, zunächst das Verhalten von *Aspergillus*-Conidien auf einer Nährlösung ohne Kolloidzusatz zu betrachten. Wird eine bestimmte Conidienmenge auf eine derartige Lösung in einer Petrischale oder einem Kolben mittels Platinöse übertragen und durch Hin- und Herbewegen gut verteilt, so bleibt der anfänglich feine Verteilungszustand nur kurze Zeit bestehen. Die Conidien lagern sich zu größeren



I II

Abb. 2. Verteilung von *Lycopodium*-Sporen auf Wasser (*I*) und auf 0,1%igem Agarsol (*II*). Die Sporen wurden zunächst durch Hin- und Herbewegen der Flüssigkeit gleichmäßig verteilt. Die Abbildung zeigt den Zustand, nachdem die Schalen einige Zeit gestanden haben und die Flüssigkeit zur Ruhe gekommen ist.

Aggregaten zusammen, die in unregelmäßigen Abständen auf der Flüssigkeitsoberfläche schwimmen. Sie koagulieren sozusagen. Auf die gleiche Erscheinung weist auch Rippel (1936, S. 215) hin. Außerdem bewegen sie sich zur Mitte des Gefäßes, wobei sie einen gleichmäßigen Abstand von der Gefäßwand innehalten. Abb. 2 I zeigt diese Verhältnisse in einem Modellversuch mit allerdings wesentlich größeren *Lycopodium*-Sporen (35 μ), die sich aber sehr ähnlich wie *Aspergillus*-Conidien (2—4 μ) verhalten. Die Folge einer derartigen Verteilung ist ein disjunktes Wachstum des Pilzes in inselartig über die Oberfläche verteilten Mycelkomplexen, wobei allerdings die anfangs freie Randzone auch bewachsen werden kann (Abb. 1).

Betrachtet man dagegen das Verhalten der Conidien oder der *Lycopodium*-Sporen auf einer Nährlösung mit 0,1%igem Agarzusatz, so stellt man fest, daß sie nach gleichmäßiger Verteilung infolge der größeren Zähigkeit der Oberfläche an Ort und Stelle liegenbleiben, wie dies Abb. 2 II zeigt. Eine nicht ganz so stabile, aber auch noch gleichmäßige Verteilung läßt sich bei 0,05%igem, nicht dagegen bei 0,01%igem Agarzusatz erreichen. Möglicherweise ist die Viscosität an der Oberfläche der

Nährlösung noch größer als die bei diesen Versuchen gemessene innere Viscosität; denn bei einer Anreicherung der Moleküle des Kolloids in der Oberflächenschicht kann eine Erhöhung der Oberflächenviscosität eintreten (vgl. Heřčík 1934, S. 97).

Die Folge der gleichmäßigen Conidienverteilung auf einer durch Agar in ihrer Viscosität erhöhten Nährlösung ist ein gleichzeitiges Auskeimen der auf der ganzen Oberfläche isoliert daliegenden Conidien. Diese haben eine viel größere Fläche zur Aufnahme der Nährstoffe aus der Lösung zur Verfügung, als es beim Wachstum der Mycelinseln auf einer Nährlösung ohne Agar der Fall ist, wo die aus dem Conidienkomplex heraustretenden Hyphen gegenseitig in stärkere Nahrungskonkurrenz treten. Als Folge der gleichmäßigen Conidienverteilung resultiert dann im Laufe der Entwicklung das Wachstum in einer geschlossenen Myceldecke (so wie dies Abb. 3 für eine andere Impfmethode zeigt). Dabei ist eine starke Beschleunigung des Mycelwachstums gegenüber der Kontrolle ohne Agar festzustellen, wie dies bereits Rippel (1936) beobachtet hatte. In erster Linie handelt es sich um eine Wachstumsbeschleunigung, denn in einer Nährlösung ohne Agar wird das maximale Ertragsgewicht lediglich später erreicht. Die absolute Förderung des Ertragsgewichtes durch Agarzusatz bleibt meist gering. Abb. 5 zeigt dieseVerhältnisse quantitativ.

Agarzusatz bewirkt also eine gleichmäßigere und feinere Verteilung der Conidien auf der Flüssigkeit, wodurch eine Entwicklungsbeschleunigung der Myceldecke insgesamt bedingt ist und weniger eine Förderung des Wachstums der Hyphen, auf die noch zurückzukommen sein wird. Um diese Schlußfolgerung zu unterbauen, wurde eine gleichmäßige Verteilung der Conidien auf einer Nährlösung auf einem anderen Wege vorgenommen. Die Conidien wurden mit Talkumpulver gut vermischt und auf die Oberfläche der Nährlösung gestäubt, so daß eine geschlossene Decke von Talkumpulver entstand. Außerdem wurde eine Nährlösung untersucht, bei der die Viscosität durch einen 0,1%igen Zusatz von Gummi arabicum erhöht worden war.

Tab. 2, Nr. 1—4, gibt die Ergebnisse dieses Versuches wieder:

Tabelle 2. *Wirkung der Sporenverteilung.*

Nr.	Synthetische Nährlösung	Ertragsgewicht nach 60 Std in mg	Förderung in %	Mycel-Wachstum	Bedeckung der Oberfläche in %
1	ohne Zusatz . . .	184	0,0	Inseln	20
2	0,1% Agar	468	154,3	Decke	100
3	0,1% Gummi arab.	466	153,3	Decke	100
4	Talkum	652	254,3	Decke	100
5	0,1% PVA	404	119,6	Decke	100
6	PVA-behandelte Conidien	467	153,8	Decke	100

Es zeigt sich, daß Agar- und Gummi arabicum-Zusatz eine fast gleiche Wachstumsförderung zur Folge haben, daß die Förderung durch die Conidienverteilung mittels Talkum jedoch wesentlich größer ist. Obwohl Talkum außer Magnesium noch Mikronährstoffe enthält, dürfte die Nährstoffwirkung allein jedoch kein so hohes Ertragsgewicht bedingt haben, so daß die Förderung auch hier in erster Linie durch die Conidienverteilung verursacht ist.

Wenn ein optimales Wachstum von *Aspergillus niger* gewährleistet werden soll, empfiehlt sich also ein 0,1% iger Agarzusatz. Da nun handelsüblicher Agar stets Mikronährstoffe und Wirkstoffe (z. B. Biotin) enthält, von denen er schwer zu befreien ist, kommt er für viele Zwecke, z. B. für Spurenelementuntersuchungen, nicht in Betracht. Auf der Suche nach einem reinen, synthetischen Kolloid stieß ich auf den wasserlöslichen Polyvinylalkohol (PVA)[1]. Er ruft, in Konzentrationen von 0,01—0,1% der Nährlösung zugesetzt, die gleiche Wirkung wie Agar hervor. Allerdings ist das erzielte Ertragsgewicht etwas geringer (vgl. Tab. 2, Nr. 5). PVA ist weitgehend frei von Mikronährstoffen und frei von Wirkstoffen. Er wird von *Aspergillus* nicht als Kohlenstoffquelle verwertet. In Konzentrationen über 1% hemmt er das Mycelwachstum.

Nun erhob sich die Frage, ob seine Wirkung, wie die von Agar, auf einer Viscositätserhöhung der Nährlösung beruht. Die Messung der Viscosität ergab die in Tab. 3 niedergelegten Werte.

Tabelle 3. *Wirkung von Polyvinylalkohol auf Viscosität und Oberflächenspannung.*

PVA in %	Viscosität in Centipoise	Oberflächenspannung in dyn/cm	Mycel-Wachstum
0,00	1,216	45,5	Inseln
0,01	1,219	50,5	Decke
0,05	1,218	45,0	Decke
0,10	1,290	48,0	Decke

Für die wachstumsfördernde Wirkung von PVA kommt also weder die Erhöhung der Viscosität noch die Erniedrigung der Oberflächenspannung in Betracht. Daß die Wirkung von PVA jedoch auf der gleichmäßigen Conidienverteilung beruht, konnte am Modellversuch mit *Lycopodium*-Sporen festgestellt werden. Dabei zeigte sich das gleiche Bild wie bei Agarzusatz (vgl. Abb. 2 II).

Demnach muß ein anderer, mit der kolloiden Natur von PVA zusammenhängender Faktor bei der Conidienverteilung wirksam sein. Um diesen zu ermitteln, wurde eine Suspension von Conidien in einer 0,1% igen Lösung von PVA in Wasser hergestellt und die Nährlösung mit 2 Tropfen,

[1] Polyvinylalkohol wurde freundlicherweise als Präparat „Polyviol W 28/02" von der Firma A. Wacker, München, zur Verfügung gestellt.

entsprechend ungefähr einer Platinöse Conidien, der dunkelbraunen Flüssigkeit geimpft. Das Ertragsgewicht betrug nach 64 Std 700 mg gegenüber 250 mg bei Impfung mittels Platinöse (Abb. 3, vgl. Tab. 2, Nr. 6). Conidien-Suspensionen in Wasser und in 0,1%igem Agarsol förderten das Wachstum nur unwesentlich. Offenbar verändert sich bei Herstellung der Suspension in der PVA-Lösung die Conidienoberfläche derart, daß eine besonders feine und gleichmäßige, auch mikroskopisch nachweisbare Verteilung der Conidien in der Flüssigkeit eintritt. Weitere Versuche zeigten, daß tatsächlich die Conidienoberfläche durch PVA verändert wird.



Abb. 3. Wachstum von *Aspergillus niger* in saurer synthetischer Nährlösung nach 64 Std bei 30° C. Die Impfung erfolgte mit 2 Tropfen einer Suspension von Conidien in einer 0,1%igen Polyvinylalkohollösung.

Bei dem schwarzbraunen Pigment, mit dem die Membranen von *Aspergillus niger* inkrustiert sind, handelt es sich nach Rippel (1927) um eine nicht einheitliche Substanz, die Merkmale natürlicher Huminsäuren aufweist. Nachdem in neuerer Zeit die in den Autolysaten von *Aspergillus niger* auftretenden Pigmente als echte Humusstoffe identifiziert werden konnten (Küster 1950, 1952), ist es durchaus möglich, daß auch der Conidienfarbstoff derselben Stoffgruppe angehört, wenngleich die endgültige physikalisch-chemische Identifizierung noch offen steht.

Der Farbstoff, auch Aspergillin genannt, wurde mit 1%iger Natronlauge extrahiert und von den Conidien abfiltriert. Er zeigt wie die Huminsäuren eine reversible Dispersität, da er in alkalischem Medium löslich ist, während er in saurem koaguliert. Setzt man dem gelösten Farbstoff

Tabelle 4.

Nr.	Conidienfarbstoff	Kolloidzusatz	Extinktion[1]
1	alkaligelöst	PVA 0,001%	1,02
2	alkaligelöst	PVA 0,01%	1,04
3	alkaligelöst	—	0,04
4	alkaligelöst	Agar 0,1%	0,01

[1] Photometer Eppendorf, Filter: Hg 546.

PVA zu, so tritt die Koagulation nach Ansäuern mit Salzsäure nicht auf. In Tab. 4 sind als Maß für die Peptisation die Extinktionswerte der nach dem Ansäuern auf p_H 1 filtrierten Lösungen wiedergegeben. Bei Nr. 1 und

2 (mit PVA-Zusatz) lief der Farbstoff durch das Filter, während bei Nr. 3 (gelöstes Aspergillin ohne PVA) und bei Nr. 4 (Agarzusatz) der durch Ansäuern entstandene Niederschlag zurückgehalten wurde, so daß hier die Extinktion die geringsten Werte aufweist. PVA besitzt also im Gegensatz zum Agar die Eigenschaft eines Schutzkolloids für den *Aspergillus*-Farbstoff.

Nach Staudinger (1950) handelt es sich beim PVA um eine linearmakromolekulare hydroxylhaltige Verbindung, die als Molekülkolloid in Wasser löslich ist und keine elektrischen Ladungen trägt. Die Stabilisierung des peptisierten *Aspergillus*-Farbstoffes in saurem Medium durch PVA wird demnach wahrscheinlich nur über eine Hydratation erfolgen.

Daß der in den Conidienmembranen vorliegende Farbstoff durch PVA im schwach sauren Bereich peptisiert und dadurch extrahiert werden kann, zeigt ein Versuch, bei dem gleiche Mengen von Conidien mit PVA-Lösung, mit Wasser und mit Agarsol behandelt wurden (Tab. 5):

Tabelle 5.

Conidien-Extraktion mit:	pH	Extinktion
0,1% PVA	6	1,75
0,1% PVA	1	0,025
Wasser	6	0,065
0,1% Agar	6	0,08

Nachdem dargelegt wurde, daß PVA die Eigenschaften eines Schutzkolloids für den extrahierten Farbstoff der Conidien von *Aspergillus niger* im sauren Bereich besitzt, und daß weiterhin der in den Membranen der Conidien vorliegende Farbstoff (und damit die Conidien selbst) durch eine PVA-Lösung peptisiert werden kann, soll das Problem der Conidienverteilung auf einer Nährlösung näher behandelt werden. Wenn sich die Conidien auf der Oberfläche einer sauren Nährlösung mit PVA-Zusatz in feinverteilter Form vorfinden, wird man sich vorzustellen haben, daß der in der Grenzschicht Nährlösung-Luft befindliche PVA mit dem Conidienfarbstoff an der Grenzfläche Nährlösung-Conidien reagiert. Allerdings werden die Conidien auf der Flüssigkeitsoberfläche nicht vollständig peptisiert, wie es in der Conidiensuspension der Fall ist, denn das käme einer Benetzung gleich, wodurch die Conidien untersinken müßten. Die Conidien schwimmen vielmehr auf der Flüssigkeitsoberfläche. Es muß sich demnach um eine Reaktion an jener Stelle der Conidien handeln, an der diese der Flüssigkeit aufliegen.

Um dies verständlich zu machen, soll die Oberflächenstruktur einer Lösung von PVA in Wasser betrachtet werden, wie sie sich aus dem Gibbs-Thompsonschen Theorem ergibt. Auf Grund der Tatsache, daß PVA die Oberflächenspannung von Wasser (gemessen = 72,7 dyn/cm) herabsetzt (0,1% PVA = 53,7 dyn/cm, 0,01% PVA = 63,8 dyn/cm, 0,001% PVA = 67,9 dyn/cm), darf man annehmen, daß er trotz seiner zahlreichen OH-Gruppen in der Oberflächenschicht enthalten und in

geringem Maße angereichert wird; und zwar in der Weise, daß hydrophobe Molekülgruppen der Luft, hydrophile dagegen dem Wasser zugekehrt sind. Hydrophobe Gruppen finden sich beim PVA in Gestalt der Restacetylgruppen (CH_3—CO—), von denen — neben dem Polymerisationsgrad — die Oberflächenspannung einer PVA-Lösung abhängt[1]. Die der Luft zugekehrten CH_3-Gruppen besitzen gegenüber dem im sauren Bereich ebenfalls hydrophoben *Aspergillus*-Farbstoff eine geringe Grenzflächenspannung, auf deren Bedeutung für die gleichmäßige Verteilung der Conidien noch eingegangen wird. Inwieweit sich die Verhältnisse einer reinen PVA-Lösung auf eine Nährlösung mit PVA-Zusatz übertragen lassen, kann nicht entschieden werden. Da sich aber die *Aspergillus niger*-Conidien und die *Lycopodium*-Sporen auf beiden Medien gleich verhalten, kann angenommen werden, daß in beiden Fällen das gleiche Prinzip wirksam ist. Eine wirkliche Klärung dieser Frage muß jedoch einer physikochemischen Untersuchung vorbehalten bleiben.

Bei der Impfmethode mit einer Conidien-Suspension in einer 0,1%igen PVA-Lösung werden die Conidien in die Nährlösung gebracht. Sie schwimmen dann nicht auf der Oberfläche. In diesem Fall dürfte es sich um eine Adsorption von PVA durch die Conidienoberfläche handeln, wobei PVA dank seiner zahlreichen Hydroxylgruppen die Conidien mit einer Solvathülle umgibt. Der PVA peptisiert also sozusagen die in grober Suspension vorliegenden Conidien ebenso wie die Farbstoffe[2]. Die auf solche Art in der Nährlösung frei umherschwimmenden und gleichmäßig verteilten Conidien, die dank der Solvathülle nicht koagulieren, vermögen dann nach Bildung eines Keimschlauches an die Oberfläche aufzusteigen (Rippel, 1936, S. 225) und eine geschlossene Myceldecke zu bilden.

Die Wachstumsbeschleunigung der Myceldecke läßt sich auch auf anderem Wege erzielen. Wie ausgeführt, ist der *Aspergillus*-Farbstoff im alkalischen Bereich löslich. Demnach müßte sich in einer alkalischen Nährlösung infolge der Peptisation der Conidien eine gleichmäßige Conidienverteilung und ein entsprechendes Wachstum erreichen lassen. Um dies zu beweisen, wurden Conidien auf alkalische (p_H 9) und saure (p_H 3) Bierwürze geimpft. Erwartungsgemäß bildete der Pilz in alkalischer Nährlösung nach 67 Std eine geschlossene Myceldecke (Trockengewicht 871 mg, Bedeckung 100%), während er in der sauren Nährlösung nur am Rande (Trockengewicht 226 mg, Bedeckung 10%) wuchs (Abb. 4). In synthetischer Nährlösung ließ sich der Versuch nicht durchführen, da hier im Gegensatz zur Bierwürze bei alkalischer Reaktion stets Nährsalze ausfallen und der Pilz infolgedessen nur schlecht wächst. Diese Wirkung alkalischer Bierwürze auf die Conidienverteilung läßt sich nicht zeigen, wenn die Viscosität der Bierwürze so groß ist, daß der Pilz auch

[1] Nach einer brieflichen Mitteilung von Herrn Dr. W. Starck, Farbwerke Hoechst.

[2] Von einer „Peptisation" der Conidien zu sprechen scheint mir statthaft, da dieser Begriff z. B. auch für den Kautschuklatex gebräuchlich ist, der ebenfalls eine grobe Dispersion darstellt.

im sauren Medium in geschlossener Decke wächst. Dies ist jedoch häufig bei relativ frischer, unverdünnter Bierwürze der Fall. Um die Viscosität zu erniedrigen empfiehlt es sich, die Bierwürze längere Zeit im Dampftopf zu erhitzen, bis die viscositätserhöhenden Stoffe ausgefallen sind. Die Ursache des ringförmigen Wachstums in Bierwürze wurde nicht näher untersucht, da sie eine sekundäre Erscheinung ist, die nicht auf der anfänglichen Sporenverteilung beruht.

Nach den Ausführungen über die Adsorption des PVA — sei es durch die Oberflächenschicht der Nährlösung oder durch die Conidienoberfläche — soll die eingangs untersuchte Frage nach der Wirkung der Oberflächenspannung der Nährlösung noch einmal betrachtet werden. Es wird nun verständlich, daß diese Größe nicht von entscheidender Bedeutung sein kann, weil sie kein Maß für die hauptsächlich interessierende Grenzflächenspannung des Grenzflächenpaares Conidien-Nährlösung abgibt. Die Conidien haben, wie die Benetzbarkeit zeigt, im sauren Medium eine große, im alkalischen Medium dagegen eine geringe Oberflächenspannung. Man kann auch sagen, daß auf saurer Lösung eine hydrophobe, auf alkalischer Lösung dagegen eine hydrophile Conidienoberfläche vorliegt. Infolgedessen ist in alkalischer Nährlösung die Grenzflächenspannung Conidien-Nährlösung so stark erniedrigt, daß die Benetzung erfolgt, während sich die Oberflächenspannung der Nährlösung gegen Luft nicht unbedingt zu ändern braucht. PVA, der an der Grenzfläche Nährlösung-Luft nur schwach capillaraktiv ist, besitzt an der Grenzfläche Nährlösung-Conidien starke capillaraktive Eigenschaften, was zur Benetzung der sonst im sauren Medium unbenetzbaren Conidien führt. Eine Benetzung der Conidien findet aber dadurch statt, daß die Grenzflächenspannung fest-flüssig durch die Adsorption des PVA an der Conidienoberfläche erniedrigt wird.



I II

Abb. 4. Wachstum von *Aspergillus niger* in alkalischer (p_H 9, *I*) und in saurer (p_H 3, *II*) Bierwürze nach 45 Std bei 30° C.

Die Wirkung des 0,1%igen Agar- und PVA-Zusatzes bei Impfung mit der Platinöse und mit einer Conidiensuspension in 0,1%iger PVA-Lösung wurde vergleichend untersucht, um quantitativ die Beschleunigung des Wachstums zu erfassen (Abb. 5). Als Kontrolle diente eine normale, mit der Platinöse beimpfte Nährlösung. Aus dem Versuchsergebnis geht hervor, daß das maximale Ertragsgewicht des Pilzes in der Agarnährlösung bereits nach 3 Tagen erreicht ist. Nach 3—4 Tagen folgt die Maximalernte in der mit PVA-Conidiensuspension beimpften Nährlösung sowie in der PVA-Nährlösung. Das höchste Ertragsgewicht der Kontrolle, das

hinter demjenigen der erstgenannten Kulturen zurückbleibt, stellt sich erst nach 5 Tagen ein. Dieser Versuch beweist nochmals die Bedeutung der auf verschiedene Art und Weise erreichten Conidienverteilung für das Mycelwachstum, namentlich für dessen Beschleunigung.

Daß bei der 0,1%igen PVA-Nährlösung eine gewisse Verzögerung gegenüber der mit PVA-Conidiensuspension beimpften eintritt, ist möglicherweise auf eine nicht so feine Conidienverteilung zurückzuführen.

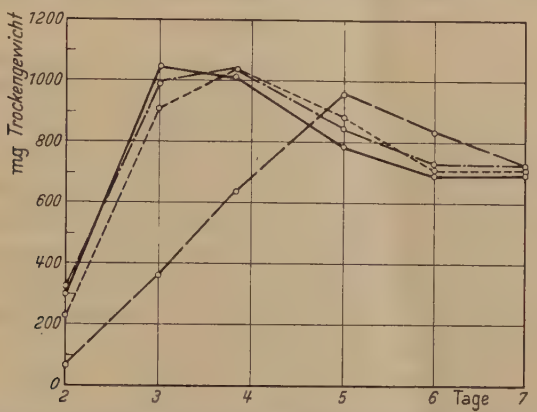


Abb. 5. Wachstum von *Aspergillus niger* je Zeiteinheit in Abhängigkeit von der Impfmethode. —— Nährlösung + 0,1% Agar. Impfung mittels Platinöse. —·—·— Nährlösung ohne Zusatz. Die Impfung erfolgte durch 2 Tropfen einer Conidiensuspension in 0,1%iger PVA-Lösung. - - - - - Nährlösung + 0,1% PVA. Impfung mittels Platinöse. — — — Kontrolle: Nährlösung ohne Zusatz. Impfung mittels Platinöse.

Dagegen dürfte die bessere Wirkung des Agars auf einer zusätzlichen Nährwirkung oder aber auf einer Wirkung der kolloiden Substanz auf das Wachstum der Hyphen beruhen. Diese zusätzlich fördernde Wirkung läßt sich auch beobachten, wenn man eine Agarnährlösung mit einer PVA-Conidiensuspension beimpft, wie folgender, nach 68 Std abgebrochener Versuch lehrt (Tab. 6):

Tabelle 6.

Nährlösung	Impfmethode	Trockengewicht in mg	Mycel-Wachstum
ohne Zusatz	Platinöse	360	Inseln
ohne Zusatz	PVA-Conidiensuspension	976	Decke
0,1% Agar	Platinöse	1039	Decke
0,1% Agar	PVA-Conidiensuspension	1140	Decke

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die Wirkung von kolloiden Substanzen wie Agar und Polyvinylalkohol auf das Wachstum von *Aspergillus niger* auf verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie Viscosität und Schutzkolloidwirkung, beruht. Dies macht

verständlich, daß die Förderung des Mycelwachstums auf verschiedene Art und Weise erreicht werden kann. Die Impfung mit einer PVA-Conidiensuspension wurde in Hunderten von Versuchen angewandt und hatte stets beschleunigtes Wachstum in einer geschlossenen Myceldecke zur Folge.

Zusammenfassung.

1. Die Oberflächenspannung der Nährlösung ist ohne entscheidenden Einfluß auf das Wachstum von *Aspergillus niger*.

2. Die wachstumsfördernde Wirkung eines 0,1%igen Agarzusatzes beruht hauptsächlich auf einer Viscositätserhöhung der Nährlösung.

3. Die Viscositätserhöhung durch den Agarzusatz hat gegenüber einer Nährlösung ohne Kolloidzusatz eine gleichmäßigere Verteilung der Conidien zur Folge. Diese bedingt eine Beschleunigung des Mycelwachstums infolge besserer Ernährungsbedingungen der einzelnen Conidien.

4. Auf einem Verteilungseffekt beruht auch die Wirkung von Polyvinylalkohol, wobei allerdings die Viscosität keine Rolle spielt.

5. Die Wirkung des Polyvinylalkohols ist in seiner Eigenschaft als Schutzkolloid für den Conidienfarbstoff zu suchen.

6. Eine ähnliche Wachstumsbeschleunigung wie durch 0,1%igen Agarzusatz läßt sich durch Impfung mit einer Suspension von Conidien in einer 0,1%igen Polyvinylalkohol-Lösung erzielen, womit eine vorteilhafte Impfmethode gegeben ist.

7. Die verschiedenen Kolloidzusätze und Impfmethoden werden vergleichend quantitativ hinsichtlich ihrer wachstumsbeschleunigenden Wirkungen untersucht.

Literatur.

Herčík, F.: Oberflächenspannung in der Biologie und Medizin. Dresden und Leipzig: Theodor Steinkopf 1934. — Küster, Eb.: Untersuchungen über die Bildung und Zersetzung von Humusstoffen durch Mikroorganismen. Arch. Mikrobiol. **15**, 1—12 (1950). — Umwandlung von Mikroorganismen-Farbstoffen in Humusstoffe. Z. Pflanzenernährg **57**, 51—57 (1952). — Pulkki, L.: Acta Chemica Fennica B. **6**, 58 (1933); zit. nach Virtanen. — Rippel, A.: Über die Wirkung von geringen Mengen Agar auf Wachstum und Stickstoffbindung von Azotobacter und auf andere mikrobiologische Vorgänge. Arch. Mikrobiol. **7**, 210—234 (1936). — Rippel, A., u. K. Walter: Über den Stickstoffgehalt des Aspergillins. Biochem. Z. **186**, 474—477 (1927). — Ruge, U.: Übungen zur Wachstums- und Entwicklungsphysiologie der Pflanze. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951. — Staudinger, H.: Organische Kolloidchemie. Braunschweig: Vieweg 1950. — Virtanen, A. I.: Bemerkung zu der Arbeit von A. Rippel: Über die Wirkung von geringen Mengen Agar auf Wachstum und Stickstoffbindung von Azotobacter und auf andere mikrobiologische Vorgänge. Arch. Mikrobiol. **7**, 488—489 (1936).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 273—292 (1954).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität in Göttingen.)

Experimentelle Untersuchungen über die Verbreitung des bakteriellen Pflanzenkrebses und das Auftreten von Sekundärtumoren*.

Von
BARBARA TAMM.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 8. März 1954.)

Der durch *Pseudomonas tumefaciens* hervorgerufene „Bakterielle Pflanzenkrebs" (crown gall) tritt auf vielen Pflanzen auf. So werden Obst- und Walnußbäume, Beerensträucher, Reben, Pappeln, Weiden, Zuckerrüben, Zierspargel und viele andere befallen (STAPP 1947). Es liegen jedoch bisher nur wenige experimentelle Untersuchungen über die Verbreitung des Pflanzenkrebses vor. Wir wissen auch nicht, warum die eine Art erkrankt, die andere gesund bleibt, und ob sich vielleicht ganze Gruppen gleichartig verhalten. Deshalb soll nachstehend durch Infektion möglichst zahlreicher Arten aus vielen Familien ermittelt werden, auf welchen durch *Pseudomonas tumefaciens* Tumoren hervorgerufen werden können und auf welchen nicht, und ob sich dabei irgendwelche Regeln erkennen lassen. Weiter wird angestrebt festzustellen, ob Bakterienvermehrung in den Impfstellen und Tumorbildung bzw. Bakterienverminderung und Nichterkrankung parallel oder invers verlaufen.

Die zur Krebserkrankung führende Infektion kann nur auf dem Wege einer Verletzung erfolgen; andernfalls kommt es trotz Anwesenheit von Bakterien im pflanzlichen Gewebe nicht zur Tumorbildung (SCHMIDT 1933). Zuweilen treten an den erkrankten Pflanzen ohne Neuinfektion in einiger Entfernung vom sogenannten „Primärtumor" weitere Wucherungen, sogenannte „Sekundärtumoren", auf. Es ist die Frage, ob auch die Sekundärtumoren sich nur nach Verletzungen bilden und ob, wenn das der Fall ist, bei einmal erkrankten Pflanzen jede erneute Verwundung einen Sekundärtumor verursacht.

I. Material und Methodik.

Alle Versuche wurden mit *Pseudomonas tumefaciens*, Stamm *Chrysanthemum frutescens II b* STAPP durchgeführt. Für die Untersuchungen über die Anfälligkeit der verschiedenen Arten (1. Versuchsgruppe) und über das Auftreten von Sekundärtumoren (3. Versuchsgruppe) wurden 4—7 Tage alte Plattenkulturen verwendet

* Auszug aus einer Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.

(1% Pepton, 1% Glucose, 0,8% Probacit[1], 1,5% Agar, neutralisiert mit NaOH; Kultur bei Zimmertemperatur). Zur Impfung wurde eine Präpariernadel, an der ein Tröpfchen von dem Bakterienrasen haftete, bis in das Mark der Pflanzenstengel eingestochen: Nadelstichmethode. Für die quantitativen Impfungen der 2. Versuchsgruppe zur Beobachtung der Bakterienvermehrung in den Impfstellen war die Nadelstichmethode nicht genau genug. Um die bei den üblichen Kultivierungsmethoden schleimigen, zusammenhängenden Kolonien von *Pseudomonas tumefaciens* gleichmäßig injizieren zu können, wurde eine Schüttelkultur benutzt. 30 bis 40 cm³ einer sterilen Nährlösung (1% Pepton, 0,8% Probacit, neutralisiert mit NaOH) wurden in 300 cm³-Erlenmeyerkolben mit einer Platinöse voll Bakterien aus einer Plattenkultur beimpft, 24 Std bei 22° C im Thermostaten belassen und anschließend 24 Std bei 16° C mit einer Frequenz von 80/min geschaukelt. So entstand eine makroskopisch homogene Aufschwemmung, die den Anforderungen auf gleichmäßige Beimpfung genügte, wie die statistische Auswertung zeigt (Tab. 1).

Tabelle 1. *Epilobium hirsutum (Versuch 11).*
Anzahl der Bakterien in den Einzelpflanzen und ihre Streuung um den Mittelwert.

a) 2 Std nach der Infektion

Pflanze Nr.	Anzahl $\times 10^5$	λ
1	0,8	—0,14
2	1,0	+0,06
3	1,4	+0,46
4	1,2	+0,26
5	0,8	—0,14
6	0,5	—0,44
7	0,8	—0,14

$M = 0{,}94 \cdot 10^5$; $\sigma = \pm 0{,}29$;
$\sigma_M = \pm 0{,}11$

b) 5 Tage nach der Infektion

Pflanze Nr.	Anzahl $\times 10^5$	λ
8	29	+ 2
9	26	— 1
10	26	— 1
11	25	— 2
12	44	+17
13	18	— 9
14	22	— 5

$M = 27 \cdot 10^5$; $\sigma = \pm 8{,}2$;
$\sigma_M = \pm 3{,}1$

$t = 8{,}1$

Für die Impfungen zu den quantitativen Versuchen wurde eine 2 cm³-Rekordspritze mit Nadel Nr. 12 bis zur Kanülenspitze gefüllt und die Nadel etwas schräg nach unten etwa 3 mm tief in den Pflanzenstengel eingestochen. Dann wurde sie unter ganz leichtem Druck auf den Kolben wieder herausgezogen. Auf diese Weise wurde versucht, nur das Einstichloch zu füllen, ohne die Injektionsflüssigkeit in das Gewebe zu pressen. Nach einiger Übung gelang es so, die Pflanzen hinreichend gleichmäßig zu beimpfen (Tab. 1).

Die quantitative Erfassung der verimpften Bakterien, wie sie für die Fragestellung der 2. Versuchsgruppe erforderlich war, war nur über einen Umweg möglich. Dazu wurden für jede Versuchsserie (je 7—8 Pflanzen) sofort nach der Beimpfung und fünf Tage danach die Internodien mit den Impfstellen herausgeschnitten und in der Impfkammer mit einem Wattebausch, der mit wenig 96%igem Alkohol getränkt war, fest abgerieben. Die Impfstelle mit ihrer Umgebung — ein etwa 1 cm langes Stengelstück — wurde mit einer Rasierklinge zu feinen Scheibchen in einem Mörser geschnitten und zerrieben[2]. Der Brei kam in ein Reagensglas mit 10 cm³ Leitungswasser, hiervon wurden 5 Verdünnungsstufen 1 : 10 hergestellt, mit Agar in Petrischalenplatten verarbeitet, 3 Tage bei 22° C bebrütet und dann aus der Zahl der ent-

[1] Probacit I Paste der Firma Maggi-Gesellschaft m.b.H., Singen/Hohentwiel.
[2] Alle Geräte, Nährböden usw. wurden natürlich sorgfältig sterilisiert.

wickelten Kolonien die Anzahl der in den Impfstellen enthaltenen Bakterien ermittelt. Hieraus wurden Mittelwert und Streuung bei jeder Serie berechnet.

Für die Zuverlässigkeit der Impftechnik einschließlich der anschließenden Methode zum quantitativen Bakteriennachweis war ein sicheres Kriterium erforderlich. Aus den 20 Versuchsserien mit den Ergebnissen der jeweils gleich im Anschluß an die Beimpfung durchgeführten Zählungen wurden deshalb die Quotienten aus Mittelwerten und mittleren Fehlern der Mittelwerte gebildet und diese Zahlen in einer Messungsreihe ausgewertet. Da diese sich als statistisch einwandfrei erwies — $^2/_3$ der scheinbaren Fehler liegen im Bereich der Dispersion — können aus den mit dieser Methode erzielten Ergebnissen unbedenklich Schlußfolgerungen gezogen werden (Tab. 2).

Tabelle 2. *Quotienten aus Mittelwerten und mittleren Fehlern der Mittelwerte und die Streuung dieser Quotienten bei den einzelnen Versuchen.*

Versuch Nr.	$\frac{M_1}{M}$	λ	λ^2	Versuch Nr.	$\frac{M_1}{M}$	λ	λ^2
1	6,1	+ 1,5	2,25	11	8,5	+ 3,9	15,2
2	2,7	— 1,9	3,6	12	8,6	+ 4,0	16,0
3	4,7	+ 0,1	0,01	13	5,0	+ 0,4	0,16
4	2,9	— 1,7	2,9	14	5,9	+ 1,3	1,7
5	1,6	— 3,0	9,0	15	3,5	— 1,1	1,2
6	8,9	+ 4,3	18,5	16	5,0	+ 0,4	0,16
7	2,2	— 2,4	5,8	17	2,9	— 1,7	2,6
8	4,6	± 0,0	0,0	18	3,7	— 0,9	0,8
9	3,4	— 1,2	1,44	19	5,0	+ 0,4	0,16
10	12,2	—	—	20	2,0	— 2,6	6,8

Summe λ^2: 88,28

$$M = 4{,}6;\ \sigma = \pm 2{,}2;\ \sigma_M = \pm 0{,}51.$$

Die Versuchspflanzen für alle drei Versuchsgruppen standen — soweit nicht anders vermerkt — im Freien, teilweise im „System" des Botanischen Gartens in Göttingen. Die Pflanzen (gleichgroße, kräftige Exemplare) wurden im Mai/Juni geimpft, ehe die Blütenbildung einsetzte. Bei Kräutern erfolgte die Impfung je nach der Länge der Pflanzen in die oberen 1—5 Internodien des Stengelteiles, der ungefähr zwischen 3 und 6 mm stark war (dünnere Stengel sind meist mechanisch zu empfindlich und dickere schon zu stark verholzt). Bei Holzpflanzen wurden die jüngsten Triebe genommen. Auf Wetterverhältnisse konnte keine Rücksicht genommen werden, nur bei Regen wurde nicht gearbeitet, um ein Abspülen der Bakterien und damit eine Verseuchung des Bodens zu vermeiden. Die Sonnenblumen für die Verwundungsversuche wurden im Alter von 4 Wochen nach der Streckung des 2. Internodiums in dessen oberes Drittel geimpft.

Um Tumoren und Wundkallus sicher auseinanderhalten zu können, wurden mikroskopische Präparate hergestellt. Die kleinen, häufig in charakteristischen „Nestern" zusammenliegenden Krebszellen lassen sich meist gut von normalen Kalluszellen unterscheiden. Als wichtigstes Kriterium ist das Auftreten von einzelnen Gefäßzellen anzusehen (Noël 1947, Appler 1951), die bei Wundkallus nie beobachtet werden konnten. Sie waren in den mit Phloroglucin-Salzsäure gefärbten Handschnitten gut zu erkennen. Diese histologischen Untersuchungen wurden im Winter an in Alkohol fixiertem Material vorgenommen.

II. Die Versuche.

1. Anfälligkeit verschiedener Dikotylen bei künstlichen Infektionen.

In den Monaten Mai und Juni 1951—1953 wurden von 387 Arten aus 68 Familien von Dikotylen mindestens je 2, meist je 3 oder mehr Pflanzen durch Nadelstich mit *Pseudomonas tumefaciens* infiziert und den Sommer über auf Tumorbildung beobachtet. Zur Kontrolle wurden von jeder Art noch zwei weitere Pflanzen auf gleiche Weise, aber mit einer sterilen Präpariernadel verletzt. Sie waren für die Gegenüberstellung von Tumor und Wundkallus — der sehr reichlich gebildet werden konnte (z. B. bei *Galega officinalis*) — wichtig. Unklare Fälle wurden mikroskopisch untersucht. An 149 Arten aus 39 Familien (38,5%) konnten Tumoren hervorgerufen werden (Tab. 3).

Die Pflanzen der gleichen Art reagierten hinsichtlich der Tumorbildung durchaus nicht immer einheitlich (Tab. 4). Von 135 in zwei Vegetationsperioden untersuchten Arten bildeten 23 (17%) in einem Jahr einen Tumor, im anderen nicht, während die übrigen Arten sich in beiden Jahren gleich verhielten. 23 Arten wurden in drei Vegetationsperioden geprüft. Hier fand sich sogar in 12 Fällen (52%) verschiedenes Verhalten. Ein zweites oder drittes Mal wurden allerdings in erster Linie nur die Arten in den Versuch genommen, die anders als die überwiegende Mehrzahl ihrer Verwandten reagierten; z. B. *Nigella sativa*, die als einzige von 19 *Ranunculaceen* erkrankte, oder *Ageratum mexicanum*, das zu den wenigen nichterkrankten *Compositen* gehört. Auffallend war, daß von den *Dialypetalen* 12% (9 von 77) der in mehreren Vegetationsperioden untersuchten Arten im einen Jahr mit, im anderen ohne Tumor reagierten, während es bei den *Sympetalen* 33% (14 von 43 Arten) waren (Tab. 4). In 4 von insgesamt 387 Fällen konnten innerhalb einer Vegetationsperiode trotz weitgehend gleicher äußerer Bedingungen — Standort, Wetter — an einigen infizierten Pflanzen Tumoren beobachtet werden, während die gleichzeitig geimpften Nachbarpflanzen derselben Art nicht erkrankt waren (*Humulus lupulus*, *Epilobium hirsutum*, *Oenothera biennis*, *Lythrum salicaria*). Diese Beobachtungen müssen bei der nachfolgenden Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

In Tab. 5 sind die Ordnungen zusammengestellt, von denen 10 und mehr Arten untersucht wurden. Einige Ordnungen waren besonders krebsanfällig: *Myrtales*, *Rhoeadales*, *Gruinales*, *Personatae*, *Rubiales* und *Synandrae* mit einer Erkrankungsziffer von über 60%. Andere dagegen erwiesen sich als sehr resistent: *Leguminosen* und *Ericales* erkrankten gar nicht, *Polycarpicae* nur zu 5%, *Centrospermae* zu 11%. Bei den anderen, hier nicht aufgeführten Ordnungen mit einer geringeren Anzahl untersuchter Arten waren die Verhältnisse ähnlich.

Tabelle 3. *Auftreten von Tumoren an verschiedenen Arten nach Infektion mit Pseudomonas tumefaciens, Stamm Chrysanthemum frutescens IIb* Stapp.

\+ Tumorbildung vorhanden, — ohne Tumorbildung,
h die Wucherungen wurden histologisch untersucht.

Größe der Tumoren: 1 stecknadelkopfgroß, 2 hirsekorngroß, 3 weizenkorngroß, 4 erbsengroß, 5 bohnengroß, 6 kirschgroß, 7 pflaumengroß.

Gattung, Art	1951	1952	1953	Größe
DIALYPETALAE				
Polycarpicae				
Ranunculaceae				
Paeonia Delavayi . .	—h	—		
„ *tenuifolia* . .	—	—		
Nigella sativa	+	+	—h	3[1]
Cimicifuga racemosa .		—		
Aquilegia chrysantha .		—		
Delphinium Bulleyan.	—	—		
„ *elatum* . .	—h	—		
Aconitum paniculat. .		—		
„ *napellus* . .		—		
Clematis recta		—		
„ *integrifolia* .		—		
Anemone japonica . .	—	—		
Ranunculus lingua .		—		
Adonis vernalis . . .	—	—		
Thalictrum minus . .		—		
„ *glaucum* .		—		
„ *angustifol.*		—		
Berberidaceae				
Podophyllum Emodi .		—		
Berberis aggregata . .		—		
Aristolochiaceae				
Aristolochia clematitis	—h	—		
Rosales				
Crassulaceae				
Sedum album		+		
„ *spurium* . . .		—		
„ *rupestre* . . .		—		
„ *aizoon*	+h	+	+	4
„ *maximum* . .	+	+	+	4
„ *telephium* . .		+	+	2
Kalanchoë grandifl.[2] .		+	+	5
„ *flamina* . .			+	4
„ *velotina* . .			+	4
„ *Faustii* . .		+	+	4
„ *quartiniana*			+	4
„ *carnea* . .		+	+	6
Kalanchoë Blossfeld.				
„*Leuchtstern*“		+	+	7
Sempervivum tectorum		—		
„ *tect.* var. *assimile*		—		
Saxifragaceae				
Astilbe Davidii . . .	—	—		
„ *grandis* . . .	—	—		
Heucheria hispida . .		—		
Ribes nigrum	+	+		4
Rosaceae				
Fragaria moschata . .		—		
Rubus illecebrosus . .		—		
Cotoneaster Dielsiana.		—		
Chamomeles Maulei .		—		
Spirea Veitschii . . .		+	—	2
Aruncus silvester . .	—h	—		
Potentilla rupestris .		—		
„ *propinqua* .		—		
„ *recta* . . .	—h	—		
„ *tormentilla* .		—		
Geum canadense . . .	—h	—h		
Filipendula ulmaria .		—		
„ *hexapetala*		—		
„ *kamtschat.*		—		
Rosa setipoda		+		4
Agrimonia odorata . .	—h	—		
„ *eupatoria* .	—h	—		
„ *fragifoliata*		—		
Sanguisorba carnea .	—h	—		
„ *dodecand.*	+	+	+	3
„ *canadens.*		—		
„ *officinalis*	—h			
Acaena eupatoria . .	+h	+		1
„ *Novae-Zeland.*		+		2
Leguminosae				
Papilionaceae				
Acacia longifolia . .		—		
Cassia marylandica .	—	—h	—h	
Sophora alopecuroides	—h	—		

[1] blumenkohlartig.
[2] Die Kalanchoëpflanzen standen bei natürlicher Tageslänge im Gewächshaus.

Tabelle 3. (Fortsetzung.)

Gattung, Art	1951	1952	1953	Größe
Thermops. caroliniana		—		
Ononis spinosa . . .	—h	—		
„ *repens*	—h	—		
Anthyllis vulneraria .		—		
Trifolium pannonic. .	—	—		
„ *rubens* . .	—	—		
„ *medium* . .	—h	—		
Medicago sativa . . .	—	—		
Melilotus officinalis .	—h	—h		
Galega officinalis . .	—h	—		
Astragalus alopecuro-ides . . .	—	—		
„ *cicer* . . .	—h	—		
Glycyrrhiza glabra . .	—h	—		
Coronilla varia . . .		—		
Desmodium canadense	—h	—		
Lathyrus silvester . .	—h			
Myrtales				
Lythraceae				
Lythrum salicaria . .	—h	±	—	
Onagraceae				
Oenothera missouriens.	—h	—		
„ *biennis* . .	—h	±		4
„ *fructicosa* .	—h	—		
Gaura longiflora . . .	—h			
Godetia grandiflora . .	+	+		4
Clarkia elegans . . .	+h	+		4
„ *pulchella* . .		+		4
Epilobium Dodonaei .	—h	+		4
„ *angustifol.*	—h	—	—	
„ *hirsutum* .	+h	+	±h	3
Fuchsia gracilis . . .		+		2
Thymelaeaceae				
Daphne alpina . . .		—		
Rhoeadales				
Papaveraceae				
Eschscholtzia californ.	—	—h		
Glaucium flavum . .		+		3
Macleya microcarpa .		—		
Corydalis glauca . . .		+		4
Capparidaceae				
Cleone violacea . . .		+		4
Polanisia graveolens .		+		4
Cruciferae				
Lepidium draba . . .		—		
Iberis amara	+	+		2
„ *sempervirens* .		—		

Gattung, Art	1951	1952	1953	Größe
Sinapis alba		+		2
Brassica nigra . . .	+	+		4
Resedaceae				
Reseda luteola . . .		+		1
Parietales				
Cistaceae				
Cistus corsicus . . .		+		3
Violaceae				
Viola elatior		—		
Loasaceae				
Blumenbachia Hieronymi		—		
Loasa tricolor	+			1
Guttiferales				
Guttiferae				
Hypericum perforat. .		—		
„ *Przewalskyanum* .		—		
Columniferae				
Malvaceae				
Lavatera thuringiaca .		—	—	
Althaea armeniaca . .		+	+	4
„ *cannabina* . .	+	+		5
„ *rosea*		—	—	
Malva silvestris . . .	+	+		4
Sida hermaphrodita .	+	+		4
Gruinales				
Geraniaceae				
Geranium pratense . .	+	+		2
Erodium gruinum . .		+		2
„ *Manescarii* .		—		
Pelargonium zonale .		+		4
Linaceae				
Linum flavum . . .		—		
Tropaeolaceae				
Tropaeolum majus . .	—	—	+	4
„ *peregrin.*		—		
Balsaminaceae				
Impatiens balsamina .	+h	+		5
„ *Roylei* . .	+h	+		5
Zygophyllaceae				
Zygophyllum fabago .	+	—	—	5
Terebinthales				
Rutaceae				
Ruta graveolens . . .	+	—h	—	3

Tabelle 3. (Fortsetzung.)

Gattung, Art	1951	1952	1953	Größe
Aceraceae				
Acer mandschuricum		—		
Anacardiaceae				
Rhus toxicodendron	—h	—h		
„ *cotinus*		—		
Celastrales				
Aquifoliaceae				
Ilex aquifolium		+		3
Celastraceae				
Evonymus alata		—		
Rhamnales				
Rhamnaceae				
Ceanothus americanus	—	—		
Vitaceae				
Vitis anurensis	—h	—		
Umbelliflorae				
Araliaceae				
Hedera helix	+	+		4
Aralia cashemirica	+	+		3
„ *racemosa*	+	+		4
„ *cordata*	+	+		3
Umbelliferae				
Conium maculatum	—h			
Pimpinella magna	—			
Astrantia major	—			
Eryngium maratim.	—	—		
„ *campestre*	—			
„ *giganteum*	—			
„ *planum*	—			
Orlaya grandiflora	+			3
Chaerophyll. aromat.	—			
„ *bulbosum*	—	—		
Hadnikia golacensis	—			
Falcaria Rivini	—	—		
Sesili montanum	—h			
Athamanta vestina	—			
Sium sisarum	+h	+	+	4
Didiscus coeruleus	+			4
Foeniculum vulgare	+	+		7
Peucedanum ruthenic.	—			
Daucus carota	—			
MONOCHLAMYDEAE				
Urticales				
Cannabinaceae				
Cannabis sativa	+h	+	+	4
Humulus lupulus	—	+	±h	3

Gattung, Art	1951	1952	1953	Größe
Urticaceae				
Parietaria officinalis	—h	—		
Laportea canadense	—h	—		
Urtica dioeca	—h	—		
Tricoccae				
Euphorbiaceae				
Euphorbia marginata	+		—	3
„ *esula*		—		
„ *iberica*		—		
„ *palustris*		—		
Mercurialis perennis	—	—		
Ricinus minor		+		4
Pachysandra terminal.	+	+		6
„ *procumb.*	—h	—		
Polygonales				
Polygonaceae				
Rumex acetosa		—		
Fagopyrum esculent.		—h		
Polygonum alpestre	—	—		
„ *divaricat.*	—h	—		
Centrospermae				
Caryophyllaceae				
Silene longiflora		+		2
„ *inflata*		+	—	2
Lychnis flos jovis	—h	—		
Melandrium album	—h			
Tunica prolifera		—		
Dianthus armeria		—		
„ *Heddewigii*		—		
Saponaria officinalis	—			
Viscaria vulgaris		—		
Cactaceae				
Opuntia camanchica		—		
8 weitere *Opuntia*-Arten		—		
Chenopodiaceae				
Chenopodium bonus Henricus		—		
Beta trigyna		—		
Salsola kali		—		
Nyctaginaceae				
Mirabilis jalapa	—h	—		
„ *longifolia*	—h	—		
Phytolaccaceae				
Phytolacca dodecandra		+		4

Tabelle 3. (Fortsetzung.)

Gattung, Art	1951	1952	1953	Größe
Portulaccaceae				
Portulacca oleracea	—			
Claytonia perfoliata		—		
SYMPETALAE				
Ericales				
Ericaceae				
Rhododendron dahuricum				
„ *hirsut.*				
Enkianthus tectus	—			
Calluna vulgaris				
Erica carnea		—		
Primulales				
Primulaceae				
Lysimachia punctata	—h	—		
„ *nummularia*	—	—		
„ *barystach.*	—h	—		
„ *vulgaris*	—h	—		
„ *aliata*	—	—		
Plumbaginales				
Plumbaginaceae				
Statice alata		—		
„ *serbica*		—		
Plumbago micrantha		—		
Contortae				
Gentianaceae				
Gentiana tibetica		—		
„ *Grombczewskii*		—		
„ *cruciata*		—		
Erythraea centaurium		—		
Apocynaceae				
Amsonia angustifolia		+		3
Apocynum cannabin.		+		3
„ *androsaemifolium*	—	+		4
Vinca minor		+		3
Asclepiadaceae				
Asclepias incarnata		+		5
„ *curassavica*		+		4
„ *tuberosa*	—	+		5
Oleaceae				
Ligustrum spec.		—		
Syringa Fauriei		—		
Jasminum fructicans		—		
Forsythia europaea		—		

Gattung, Art	1951	1952	1953	Größe
Buddleia Forrestii		—	—	
Tubiflorae				
Convolvulaceae				
Convolvulus cneorum		+		3
„ *tricolor*		—		
Boraginaceae				
Omphalodes linifolia		—		
Cerinthe minor		—		
Eritrichium strictum		—		
Cynoglossum german.		+		2
Symphytum officinale		—		
Anchusa officinalis	—	—		
„ *azurea*		—		
Lycopsis arvensis		—		
Borago officinale		—		
Echium vulgare	+	—	+	4
Labiatae				
Rosmarinus officinalis	+	—		
Teucrium botrys		—		
„ *scorodonia*	—h			
„ *chamaedris*	—			
Ajuga genevensis		—		
Monarda fistulosa	—	—		
Scutellaria alpina	—h	—		
Salvia officinalis		—		
„ *glutinosa*	—h	—	—	
„ *Przewalskii*		—		
„ *sclarea*		+	+	5
„ *verticillata*	—		±	4
Galeopsis speciosa		—		
Stachys silvaticus	—h	—h	—	
„ *rectus*		+		3
„ *lanatus*		—h		
„ *officinalis*	—h			
Ballota nigra	—h			
Prunella vulgaris	—h			
Marrubium vulgare		+		4
Leonurus cardiaca	+			4
Lycopus europaeus	—h			
Physostegia virginica	—h			
Satureja calamintha	—h			
Hyssopus officinalis	—h			
Nepetha macrantha	+			2
„ *nuda*	+			3
Mentha piperita	—h			
„ *longifolia*	—h			
Koellia virginiana	—h			
Origanum vulgare	—h			

Tabelle 3. (Fortsetzung.)

Gattung, Art	1951	1952	1953	Größe
Verbenaceae				
Caryopsis incana . .	—h	—		
Vitex agnus castus. .	—h	—		
Verbena canadensis .	+			4
Polemoniaceae				
Phlox Drummondii .	—h			
„ *paniculata* . .	—h	—		
Hydrophyllaceae				
Phacelia tanacetifolia.		—		
Personatae				
Solanaceae				
Anisodus luridus . .	+	—		4
Atropa belladonna . .		+		3
Nicandra physaloides		+		4
Solanum nigrum . .		+		4
„ *tuberosum* .	+	+		4
„ *tabacum* . .	+			5
„ *lycopersicum*	+			5
Capsicum annuum. .	+			4
Physalis alkekengi. .	+	+		3
Nicotiana tabacum. .	+	+		4
„ *rustica* . .	+			6
Salpiglossis sinnata .		+		3
Datura stramonium .	+h			5
Petunia violacea. . .	—	+		4
Scrophulariaceae				
Scrophularia nodosa .	—h	—		
Verbascum thapsus. .	—			
„ *nigrum*. .	—h	—		
Maurandia scandens.		+		4
Anthirrhinum majus .		+		4
Gratiola officinalis. .		—		
Linaria spurica . . .				
„ *vulgaris*. . .		—		
Diascia barbarae . .		—		
Celsia arcturus . . .				
Digitalis purpurea . .	+	—	—	3
„ *lutea*. . . .		—		
„ *ambigua* . .	—			
Veronica Bishopiana.		+	—	3
„ *virginica*. .	—h	—	—	
„ *longifolia*. .	+	—	+	3
„ *teucrium* . .		—		
Mimulus cardinalis .	+			
Pentstemon barbatus .	+		—	5
„ *digitalis* .	—h		—	
„ *hybr.* . .	+			4

Gattung, Art	1951	1952	1933	Größe
Orobanchaceae				
Orobanche crenata . . (auf *Vitex agnus castus*)		—		
Bignoniaceae				
Incarvillea Olgae. . .	—h	—		
Rubiales				
Rubiaceae				
Galium mollugo . . .	—			
„ *silvaticum* . .	+		+	2
„ *verum*. . . .	—h			
Rubia tinctorum. . .	—			
Acanthaceae				
Acanthus longifolius .	—h			
Valerianaceae				
Centranthus ruber . .	+			4
Valeriana officinalis .	+			4
Dipsacaceae				
Knautia silvatica . .	+			
Cephalaria alpina . .	+			5
„ *tartarica* .	+			4
Dipsacus lacinatus. .	+			3
„ *pilosus* . .	+			3
Scabiosa atropurpurea	+			4
Synandrae				
Campanulaceae				
Campanula sarmatica	—h		—	
„ *pyramid.*		+		5
„ *glomerata*	—h			
„ *rotundifol.*	+			2
Platycedon grandifol..	+			4
Codenopsis clematidea	—h			
Asyneuma canescens .	+			4
Adenophora stricta . .	+			5
„ *diplodont.*	—h			
„ *liliifolia* .	—h			
Jasione perennis . .	—h			
Lobeliaceae				
Lobelia syphilitica . .	+			5
Compositae				
Eupatorium purpur. .	—h			
„ *cannabin.*	+			4
Veronia noveboracens.	—h			
Aster amellus	+			4
„ *novae Angliae* .	—h			
„ *novi Belgii* . .	—h			

Tabelle 3. (Fortsetzung.)

Gattung, Art	1951	1952	1953	Größe	Gattung, Art	1951	1952	1953	Größe
Solidago serotina . .	—h				*Artemisia dracuncul.*	+			4
„ *canadensis* .	+			3	*Echinops communitat.*	+			4
Buphthalmum specios.	+			4	*Centaurea macroceph.*	—h			
Inula helenium . . .	—h				„ *ruthenica* .	—			
„ *salicina*	—h				*Scorzonera hispanica* .	—h			
„ *ensifolia* . . .	—h				*Crepis blattaroides* . .	+			3
Coreopsis auriculata .	—h				*Hieracium umbellatum*	+			4
Heliopsis laevis . . .	+				*Chrysanth. inodorum* .	+			
Rudbeckia laciniata .	+			2	„ *coronarium*	+			5
„ „Meine Freude“	+			3	*Helichrysum bracteat.* .	+			4
Silphium trifoliatum .	+			5	*Cosmos* spec.	+			3
Helianthus annuus . .	+h	+	+	7	*Zinnia elegans* . . .	+			4
„ *grosse-serratus* .	—h		—		„ *Haageana Reg.*	+			
					Gaillardia pulchella .	+			4
Achillea ptarmica . .	+			4	*Tagetes patula* . . .	+			5
„ *millefolium* .	+			5	*Callistephus chinensis*	+			5
Helenium autumnale .	+			6	*Helipterum roseum* . .	+			3
Senecio umbrosus . .	+			4	*Ageratum mexicanum*	—h	—	+h	4
Artemisia Ludovician.	—h				*Cirsium canum* . . .	—h			

Bei den Familien kommt die gleichartige Reaktionsweise zum Teil noch stärker zum Ausdruck als bei den Ordnungen. So erkrankten von folgenden Familien sämtliche infizierten Arten: *Solanaceen* (14 Arten), *Dipsacaceen* (6 Arten), *Apocynaceen* und *Araliaceen* (je 4 Arten). Die *Papilionaceen* (19 Arten) und *Oleaceen* (5 Arten) dagegen waren völlig resistent. Bei den *Rosaceen* wurde entgegen den älteren Literaturangaben (Stapp 1928), die von einer besonders hohen Anfälligkeit sprechen, nur eine 20%ige Erkrankungsrate gefunden.

Tabelle 4. *Erkrankungsziffern der mehrfach untersuchten Arten.*

		Familien	Arten	Tumorbildung		nicht in jedem Jahr erkrankt	
				stets	nie	Anzahl	in %
Unterklasse	*Dialypetalae*	20	77	27	41	9	12 ± 4
	Sympetalae	16	43	6	23	14	33 ± 7
	Monochlamydeae	6	15	2	10	3	20 ± 10
In 1 Vegetationsperiode untersucht . .			387	149	238	—	— —
In 2 Vegetationsperioden untersucht .			135	36	76	23	17 ± 3
In 3 Vegetationsperioden untersucht .			23	6	5	12	52 ± 10

Von den Gattungen bildeten einige immer Tumoren (z. B. *Kalanchoë* mit 7, *Solanum* mit 4 Arten) und andere nie (z. B. *Opuntia* mit 9, *Lysimachia* mit 5 Arten). Dieses gleichmäßige Verhalten zeigte jedoch nur

knapp die Hälfte der mit drei und mehr Arten geprüften Gattungen (12 von 27) (Tab. 6). Demnach ist die Reaktionsweise auf *Pseudomonas tumefaciens* wohl auch nicht gattungsspezifisch.

Tabelle 5. *Erkrankungsraten der Ordnungen mit mehr als 10 untersuchten Arten.*

Ordnung	Familien	Gattungen	Arten	erkrankte Arten	
				Anzahl	% ± σ_M
Polycarpicae	3	14	20	1	5 ± 5
Rosales	3	19	43	17	40 ± 7,5
Leguminosae	1	15	19	—	— —
Myrtales	3	9	13	8	61 ± 13
Rhoeadales	4	11	12	8	67 ± 13
Gruinales	5	7	10	7	70 ± 14
Umbelliflorae	2	17	23	8	35 ± 10
Dialypetalae gesamt . .	34	108	161	57	35 ± 3,8
Centrospermae	6	15	26	3	11 ± 6
Monochlamydeae gesamt	10	27	43	8	19 ± 6
Contortae	4	11	16	7	44 ± 11
Tubiflorae	6	35	49	12	24 ± 6
Personatae	4	24	37	22	60 ± 8
Rubiales	4	9	13	9	69 ± 13
Synandrae	3	37	55	34	62 ± 6
Sympetalae gesamt . .	24	123	183	84	46 ± 3,7
Gesamtzahlen	68	258	387	149	39 ± 2,5

Tabelle 6. *Gattungen, von denen drei und mehr Arten infiziert wurden.*

Gattung	Arten	Tumorbildung			mehrfach geprüft
		mit	ohne	wechselnd	
Thalictrum .	3	—	3	—	—
Sedum . .	6	4	2	—	2
Kalanchoë .	7	7	—	—	4
Potentilla .	4	—	4	—	1
Filipendula	3	—	3	—	—
Agrimonia .	3	—	3	—	2
Sanguisorba	4	1	3	—	2
Trifolium .	3	—	3	—	3
Oenothera .	3	—	2	1	3
Epilobium .	3	1	1	1	3
Althaea . .	3	2	1	—	3
Aralia . . .	3	3	—	—	3
Eryngium .	4	—	4	—	1
Euphorbia .	4	—	3	1	1
Opuntia . .	9	—	9	—	—
Lysimachia	5	—	5	—	5
Gentiana . .	3	—	3	—	—
Asclepias . .	3	2	—	1	1
Salvia . . .	5	1	3	1	3
Stachys . .	4	1	3	—	1
Solanum . .	4	4	—	—	1
Digitalis . .	3	1	2	—	—
Veronica . .	4	1	2	1	3
Pentstemon	3	1	1	1	2
Galium . .	3	1	2	—	1
Campanula .	4	2	2	—	1
Adenophora	3	1	2	—	—
	106				

2. *Das Verhalten der Bakterien in den Impfstellen.*

Das Verhalten der Bakterien in den Impfstellen — Vermehrung oder Abnahme — wurde durch Zählungen unmittelbar nach der Infektion und fünf Tage danach ermittelt. Die Versuche konnten auf 5 Tage beschränkt werden, weil die ersten vier Tage nach der Impfung der Pflanzen für die Umstimmung der normalen Zelle zur Krebszelle allein entscheidend sein und die Bakterien nach diesen ersten Tagen keinen Einfluß mehr auf die Tumorbildung ausüben sollen (Braun 1943).

Es wurden 20 Versuchsserien an 13 verschiedenen Arten durchgeführt. Für jede Serie wurden 20 Pflanzen geimpft, und zwar je 8 für die beiden Zählungen gleich nach der Impfung und fünf Tage danach sowie 4 Kontrollen für die Beobachtung einer eventuellen Tumorbildung. Aus diesen Versuchsserien konnten zweimal 20 Messungsreihen aufgestellt werden, von denen sich 33 als statistisch einwandfrei erwiesen. Eine Versuchsserie mit zwei solchen Reihen ist in Tab. 1 dargestellt.

Tabelle 7. *Bakterienentwicklung bei den Arten mit Tumorbildung.*

Nr.	Art	M_1	M_2	M_2/M_1	t
1	*Helianthus annuus* . . .	$(1{,}1 \pm 0{,}18)\ 10^7$	$(4{,}3 \pm 2{,}1)\ 10^7$	3,9	1,5
3	*Ageratum mexicanum* .	$(0{,}9 \pm 0{,}19)\ 10^7$	$(2{,}1 \pm 0{,}2)\ 10^7$	2,35	4,0
5	*Salvia sclarea*	$(1{,}4 \pm 0{,}88)\ 10^5$	$(140 \pm 30)\ 10^5$ $(9{,}3 \pm 1{,}2)\ 10^5$	100 6,6	4,6 5,3
7	*Veronica longifolia* . .	$(2{,}7 \pm 1{,}23)\ 10^5$	$(13{,}3 \pm 3{,}14)\ 10^5$	4,9	3,2
9	*Campanula sarmatica* . .	$(10{,}0 \pm 2{,}9)\ 10^5$	$(35 \pm 13{,}6)\ 10^5$	3,5	1,8
11	*Epilobium hirsutum* . .	$(0{,}94 \pm 0{,}11)\ 10^5$	$(27 \pm 3{,}1)\ 10^5$	29	8,1
16	*Tropaeolum majus*. . . . Freiland, jung	$(1{,}9 \pm 0{,}38)\ 10^4$	$(107 \pm 27)\ 10^4$	51	3,9
17	*Tropaeolum majus*. . . . Freiland, älter	$(2{,}0 \pm 0{,}7)\ 10^7$	$(28{,}8 \pm 8{,}8)\ 10^7$	14	3,2
18	*Tropaeolum majus*. . . . Kalthaus, jung	$(2{,}0 \pm 0{,}55)\ 10^6$	$(10{,}8 \pm 1{,}6)\ 10^6$	5,4	4,7
19	*Tropaeolum majus*. . . . Kalthaus, älter	$(1{,}9 \pm 0{,}38)\ 10^6$	$(246 \pm 41)\ 10^6$ $(44 \pm 7{,}4)\ 10^6$	130 23	6,0 5,6
20	*Tropaeolum majus*. . . . Treibhaus, alt	$(3{,}4 \pm 1{,}68)\ 10^5$	$(180 \pm 70)\ 10^5$	53	2,5

Bedeutung

M_1 = Mittelwerte der im Anschluß an die Impfungen durchgeführten Zählungen.

M_2 = Mittelwerte der 5 Tage danach durchgeführten Zählungen.

M_2/M_1 = Vermehrungsfaktor der Bakterien.

t = statistische Sicherung der Differenz $M_2 - M_1$ nach der t-Verteilung.

Im einzelnen ergab sich folgendes: In 11 von den 20 Serien (55%) wiesen die Kontrollen Tumoren auf (Tab. 7). Bei den zugehörigen Zählungen konnte hier immer Bakterienvermehrung festgestellt werden; sie war in 8 Fällen statistisch gut gesichert ($t > 3$), einmal wahrscheinlich ($t = 2{,}5$) und zweimal nicht gesichert. In weiteren 8 Versuchen (40%) ließen die Kontrollen keine Tumorbildung erkennen (Tab. 8). Hier fand sich fünfmal (62%) statistisch gesicherte Vermehrung ($t > 3$) und zweimal (25%) statistisch gesicherte Abnahme der Bakterienzahl, während einmal die Zahl der Bakterien unverändert blieb.

Auffällig ist, daß die Tumorbildung bei den Kontrollen immer mit einer Zunahme der Bakterienzahl einherging, andererseits in 25% der ohne Tumor gebliebenen Pflanzen eine Abnahme der Bakterienzahl gefunden wurde. Eine Korrelation konnte jedoch nicht errechnet werden. Nur bei *Ageratum mexicanum* konnte eine gewisse Korrelation nachgewiesen werden, insofern als hier nicht nur im Winter bei Bakterienabnahme die Tumorbildung ausblieb (Tab. 8, Nr. 4), sondern auch im

Tabelle 8. *Bakterienentwicklung bei den Arten ohne Tumorbildung.*

Nr.	Art	M_1	M_2	M_2/M_1	t
2	*Helianthus grosse-serratus*	$(7{,}6 \pm 2{,}85)\ 10^4$	$(300 \pm 76)\ 10^4$	39,5	3,85
4	*Ageratum mexicanum* .	$(25 \pm 8{,}6)\ 10^5$	$(3{,}6 \pm 0{,}74)\ 10^5$	0,14	2,5
6	*Salvia verticillata* . .	$(2{,}5 \pm 0{,}28)\ 10^5$	$(0{,}7 \pm 0{,}11)\ 10^5$	0,28	6,0
8	*Veronica virginica* . .	$(0{,}32 \pm 0{,}07)\ 10^4$	$(33 \pm 4{,}3)\ 10^4$ $(170 \pm 25)\ 10^4$	100 510	7,6 6,8
12	*Epilobium hirsutum* . .	$(0{,}43 \pm 0{,}05)\ 10^5$	$(10{,}5 \pm 2{,}7)\ 10^5$	24,7	3,7
13	*Epilobium angustifolium*	$(8{,}1 \pm 1{,}6)\ 10^5$	$(127 \pm 10{,}5)\ 10^5$	15,7	10,8
14	*Pentstemon digitalis* . . .	$(2{,}2 \pm 0{,}37)\ 10^6$	$(17{,}8 \pm 4{,}0)\ 10^6$	8,1	3,8
15	*Pentstemon barbatus* . . .	$(11{,}3 \pm 3{,}26)\ 10^6$	$(5{,}5 \pm 2{,}07)\ 10^6$	0,5	1,5

Tabelle 8a. *Unterschiedliches Verhalten der geimpften und der Kontrollpflanzen.*

10	*Epilobium hirsutum*	$(27{,}4 \pm 2{,}24)\ 10^4$	$(46 \pm 15)\ 10^4$ $(2{,}9 \pm 1{,}2)\ 10^4$	1,7 0,11	1,25 9,8

Bedeutung

M_1 = Mittelwerte der im Anschluß an die Impfungen durchgeführten Zählungen.

M_2 = Mittelwerte der 5 Tage danach durchgeführten Zählungen.

M_2/M_1 = Vermehrungsfaktor der Bakterien.

t = statistische Sicherung der Differenz $M_2 - M_1$ nach der t-Verteilung.

Sommer bei Zunahme der Bakterienzahl Tumoren auftraten (Tab. 7, Nr. 3). Bei der Versuchsserie, die ohne Tumor geblieben war, wurden die Bakterien im Anschluß an die zweite Zählung aus einer der für die Zählungen bestimmten Plattenkulturen erneut kultiviert und in *Helianthus annuus* eingeimpft, wo sie normale Tumorbildung auslösten. Demnach war ihre Virulenz durch den fünftägigen Aufenthalt in den nichtanfälligen Pflanzen nicht herabgesetzt. Die beiden anderen Arten ohne Tumorbildung mit Abnahme bzw. Konstanz der Bakterienzahl — *Salvia verticillata* und *Pentstemon barbatus* (Tab. 8, Nr. 6 und 15) — reagierten nach mehrmaligen Impfungen in Versuchsgruppe 1 ebenfalls teilweise mit, teilweise ohne Tumorbildung. Ob sich hier aber bei der beobachteten Tumorbildung die Bakterien wie im Falle des *Ageratum mexicanum* ebenfalls vermehrt haben, wurde leider nicht festgestellt. Es kann auch nichts darüber ausgesagt werden, unter welchen Bedingungen sich die Bakterien vermehren oder vermindern bzw. wann ein Tumor gebildet wird und wann nicht.

Bei den 4 Kontrollen von *Epilobium hirsutum* (Tab. 8a) fand sich nur zweimal ein Tumor. Auch die Bakterien verhielten sich unterschiedlich: in drei Pflanzen Konstanz der Bakterienzahl und in fünf gesicherte Abnahme ($t = 9{,}8$). Leider läßt die Versuchsanordnung nicht erkennen, ob die Pflanzen, bei denen eine Bakterienabnahme beobachtet wurde, den nichterkrankten Kontrollen entsprechen oder umgekehrt. Daher lassen sich die Ergebnisse dieses Versuches nicht mit denen der anderen zusammen auswerten. Auch in zwei weiteren Versuchen reagierte *Epilobium hirsutum* auf die Bakterieninvasion verschieden. Während die älteren, schon Knospen zeigenden Pflanzen Tumorbildung aufwiesen (Tab. 7, Nr. 11), blieben kleinere, weniger weit entwickelte Pflanzen ohne Tumoren (Tab. 8, Nr. 12). In beiden Fällen wurde hier Bakterienvermehrung beobachtet.

Besonders erwähnt werden müssen ferner die fünf Versuche an *Tropaeolum majus* (Tab. 7, Nr. 16—20). Bei dieser Art haben Winter und Willeke (1952) ein gasförmiges Antibioticum beschrieben, das in eigenen Versuchen nach der von Winter und Willeke beschriebenen Methode auch gegen *Pseudomonas tumefaciens* in vitro wirksam war (Tab. 9). Trotzdem fanden sich in allen fünf Versuchen, in denen die Pflanzen unter verschiedenen Bedingungen untersucht wurden [junge Pflanzen bei der Entfaltung des 3. und 4. Blattes im Freiland und in einem schattigen

Tabelle 9. *Wachstumsverzögerung bei Pseudomonas tumefaciens nach 24—96 Std in Anwesenheit von Tropaeolum majus-Preßsaft.*

cm³	24	48	72	96 Std
1,0	—	—	—	+
0,5	—	—	+	+
0,25	—	+	+	+
K	+	+	+	+

K Kontrolle; + Bakterien nachweisbar.

Gewächshaus (Nr. 16 und 18), die gleichen Pflanzen einen Monat später (Nr. 17 und 19) sowie Pflanzen vom Dezember des Vorjahres (Nr. 20)], Bakterienzunahme und Tumorbildung. Der aus Blattstielen und Blättern derselben Pflanzen, in denen die Bakterienvermehrung beobachtet wurde, hergestellte Preßsaft erwies sich auch hierbei in allen Fällen als antibiotisch wirksam, selbst der aus den kümmerlich entwickelten Gewächshaus-Pflanzen.

Mit aller Vorsicht läßt sich aus diesen Versuchen schließen, daß die Wahrscheinlichkeit der Tumorbildung bei Bakterienvermehrung größer ist als bei Bakterienabnahme in den infizierten Pflanzen.

3. Über die Entstehung der Sekundärtumoren.

Unter welchen Bedingungen Sekundärtumoren hervorgebracht werden, ist noch kaum bekannt. Sind sie weit genug — einige Internodien — von der Infektionsstelle mit dem Primärtumor entfernt, können in ihnen keine Bakterien mehr nachgewiesen werden (Braun und White 1942). Man nimmt deshalb an, daß sie nicht durch die Bakterien unmittelbar ausgelöst werden. Wir wissen aber noch nicht, ob es sich bei der Bildung der Sekundärtumoren um eine Wirkung von Stoffwechselprodukten der Bakterien oder der Krebszellen des Primärtumors handelt, denn bisher ist es noch nicht gelungen, sie durch Auszüge aus Bakterienkulturen (Stapp und Bortels 1931), durch Tumorextrakte (Dame 1938) oder durch sterile Tumorpreßsäfte (White und Braun 1942) auszulösen. Von den Primärtumoren wissen wir, daß sie nie ohne Verletzung auftreten, selbst dann nicht, wenn die Bakterien sich im Grundgewebe der Pflanzen befinden (Schmidt 1933). Braun (1947) konnte an Pflanzen, die wegen zu hoher Temperaturen nach der Infektion keine Primärtumoren gebildet hatten, solche doch noch hervorrufen, wenn er bei niedrigerer Temperatur die Impfstelle mit einer sterilen Nadel nochmals verletzte. In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde der Einfluß von Verletzungen auf die Entstehung der Sekundärtumoren untersucht. Schon Stapp (1947) hatte bei Tomaten die Bildung von Sekundärtumoren veranlassen können, wenn er Leitbündel infizierte und diese in Entfernungen von weniger als 15 cm nochmals mit einer sterilen Nadel verletzte.

In unseren Versuchen an Sonnenblumen wurden bei einem Teil der Pflanzen die Blattstiele an den ersten sechs Knoten oberhalb der Impfstelle durch flaches Anritzen (einmal je Stiel) oder durch fünf hintereinanderliegende Stiche mit einer sterilen Präpariernadel bzw. durch vorsichtiges Einknicken des Blattstieles, nach dem es aber nicht zum Welken des Blattes kommen durfte, verletzt. Bei einem Viertel der Versuchspflanzen wurden die Stengel ebenfalls oberhalb der Impfstelle über ihre ganze Länge etwa 15mal durch bis ins Mark reichende Stiche verletzt. Die Verletzungen wurden an insgesamt 423 Pflanzen gesetzt, und zwar an je etwa 140 Pflanzen 9, 18 und 27 Tage nach der Infektion. 188 infizierte Kontrollen wurden nicht verletzt, um einen Überblick über die Zahl der spontan auftretenden Sekundärtumoren zu haben. Ferner standen 75 nichtinfizierte Pflanzen im Versuch, die in

gleicher Weise und zu denselben Zeitpunkten wie die anderen Pflanzen verwundet wurden, um Aussehen und Stärke sowie mikroskopischen Bau des Wundkallus dem Tumorgewebe gegenüberstellen zu können. In allen nicht völlig eindeutigen Fällen wurde der Befund durch mikroskopische Untersuchungen gesichert.

Bei 611 Versuchspflanzen mit experimentell hervorgerufenem Primärtumor wurden bei mehreren Tausend Verletzungen insgesamt 41 Sekundärtumoren (6,7%) gefunden; hiervon fanden sich 13 an absichtlich gesetzten Verletzungen, 8 an spontan aufgetretenen, grob sichtbaren Verletzungen, 18 an Blattfallnarben und nur 2 an Blattstielen, bei denen eine vorausgegangene Verletzung nicht sichtbar war, aber auch nicht ausgeschlossen werden konnte. Hieraus kann wohl mit Sicherheit geschlossen werden, daß eine Verletzung der primär infizierten Pflanze Voraussetzung für die Bildung der Sekundärtumoren ist.

Wenn bei insgesamt etwa 6000 absichtlich gesetzten Verletzungen und einer wohl noch größeren Zahl Spontanverletzungen durch Windbruch, Tierfraß, Hagel usw. nur so verschwindend wenig Sekundärtumoren beobachtet werden konnten, müssen zur Bildung der Sekundärtumoren neben der sicher notwendigen Verletzung aber noch andere, bisher unbekannte Faktoren eine Rolle spielen.

Eine Abhängigkeit von der Art der Verletzung — Ritz, Stich, Abknickung — und von der Zeit, die zwischen Infektion und Verwundung verstrichen war, ließ sich nicht feststellen. An den Stengeln konnte durch Stiche in die Internodien niemals Sekundärtumorbildung ausgelöst werden. Sie entstanden hier aber im Anschluß an den Primärtumor spontan an tiefen Längsrissen, die auch bei nichtinfizierten Pflanzen häufig auftraten. Oberhalb des dritten Knotens über der Impfstelle konnten keine Sekundärtumoren mehr beobachtet werden.

Bei diesen Ergebnissen fällt der sehr niedrige Prozentsatz (6,7%) aufgetretener Sekundärtumoren auf, der ganz im Gegensatz zu den in der amerikanischen Literatur (Braun und White 1942) genannten Zahlen steht. Diese Autoren beobachteten spontan aufgetretene Sekundärtumoren an 30—60% ihrer *Helianthus annuus*-Pflanzen.

Für diesen Unterschied können mehrere Ursachen verantwortlich sein, z. B. die Verwendung verschiedener Bakterienstämme und Sonnenblumenarten. Der von uns verwendete Bakterienstamm *Pseudomonas tumefaciens Chrysanthemum frutescens IIb* Stapp wird auch in der amerikanischen Literatur häufig genannt. Braun und White geben den Bakterienstamm aber leider nicht an. Die von ihnen verwendete *Helianthus annuus* var. „*Giant Russian*" stand in Göttingen leider nicht zur Verfügung. Es mußte deshalb mit den bei uns im Handel üblichen Sonnenblumen gearbeitet werden, die kein genetisch einheitliches Material darstellen. Sodann haben Braun und White ihre Pflanzen in Töpfen im Gewächshaus gehalten, während unsere nicht in Töpfen als Freilandpflanzen aufwuchsen. Hier entwickelten sie sich zu äußerst kräftigen, bis 5 m hohen Pflanzen. Da in Erwägung gezogen werden mußte, daß sie gewissermaßen zu gesund waren, um an Krebs mit Sekundärtumoren zu erkranken, wurden, um schwächlichere Pflanzen zur Verfügung zu

haben, noch in zwei Pikierkästen je 20 Pflanzen im Gewächshaus und daneben 25 Pflanzen in Töpfen im Freien gehalten und mit Nadelstich geimpft. Diese Pflanzen wurden nur etwa 50—80 cm hoch. Bei den 25 nicht absichtlich verletzten Freilandpflanzen fand sich einige Wochen später nur ein einziger Sekundärtumor, was dem in unseren Versuchen gefundenen Prozentsatz eher als dem von den amerikanischen Autoren genannten entspricht.

An den 40 nur etwa bleistiftstarken Sonnenblumen im Gewächshaus konnten zwei Monate nach der Impfung gar keine Sekundärtumoren, sondern lediglich in 11 Fällen Stengelverdickungen im Internodium des Primärtumors beobachtet werden (Abb. 1). Diese Verdickungen waren meist nicht drehrund, sondern genau über dem Tumor stärker ausgebildet oder überhaupt nur dort vorhanden. Im Schnitt zeigte sich, daß die Verdickungen durch radiale Streckung und Querteilung der Markzellen, die an das Primärxylem grenzten, hervorgerufen wurden. Die Rinde blieb unbeeinflußt. Es handelte sich offenbar um die gleichen Bildungen, die Braun (1941) beschrieben und ebenfalls nicht zu den Sekundärtumoren gezählt hatte.



Abb. 1. Stengelverdickungen durch radiale Streckung der Markzellen.

III. Besprechung.

Zu Versuchsgruppe 1 (Anfälligkeit verschiedener Arten): Die Angaben in der Literatur über die Verbreitung des *tumefaciens*-Krebses beruhen meist nur auf Beobachtungen spontan aufgetretener Erkrankungen und sind häufig in ihrer Bezeichnung sehr allgemein: Pappeln, Weiden, Rosen und andere. Eine Zusammenstellung von einigen 30 Arten gibt Stapp (1928) und erwähnt hier schon die „Erkrankung verschiedenster, im System zum Teil weit auseinanderliegender Familien". Experimentelle Untersuchungen zu dieser Frage liegen von Cl. O. Smith (1913, 1925) vor. In der jüngeren der beiden Arbeiten prüfte er mehrere *Prunus*-Arten und stellte erhebliche Unterschiede in der Anfälligkeit für *Pseudomonas tumefaciens* fest. So schwankte z. B. der Befall der einzelnen Unterarten von *Prunus domesticus* zwischen 3 und 95%. Aus der Tatsache, daß die meistbenutzten Versuchspflanzen — *Helianthus annuus*, *Solanum lycopersicum* und andere — stets 100%ig erkranken, darf also nicht gefolgert werden, daß das bei anderen Objekten auch immer so sei, wie es sich ja auch aus den oben beschriebenen Versuchen eindeutig ergibt.

Die vorstehend geschilderten Untersuchungen zeigen nun, daß der Kreis der krebsanfälligen Pflanzen viel größer ist, als bisher bekannt war. Fast 40% von den 387 untersuchten Arten erkrankten. In vielen Fällen ließ sich zeigen, daß alle untersuchten Arten eines Verwandtschaftskreises — Gattung, Familie — die Infektion gleichartig beantworten. Ähnlich, wenn auch weniger deutlich, war es auch noch bei den Ordnungen. Andererseits gab es aber auch Arten, bei denen die Einzelpflanzen sich verschieden verhielten. Eine Erklärung für diese Verhältnisse kann auf Grund des vorliegenden Materials nicht gegeben werden.

Auffallend war der entgegen den Literaturangaben (Stapp 1928) verhältnismäßig geringe Befall der *Rosaceen* (5 von 23 Arten). Diese Differenz beruht wahrscheinlich auf einer unbeabsichtigten Auswahl der Arten. Während nämlich Stapp nur von den zahlreichen Holzpflanzen dieser Familie spricht, die als Obstbäume und Beerensträucher unter sorgfältiger gärtnerischer Kontrolle stehen, sind in den hier vorliegenden Versuchen die wirtschaftlich weniger wichtigen und daher auch nicht so beachteten krautigen *Rosaceen* untersucht worden.

Zu Versuchsgruppe 2 (Verhalten der Bakterien in der Impfstelle): Wie wir wissen, geht die Tumorbildung in zwei Schritten vor sich (Gäumann 1951): 1. Umstimmung der normalen Zelle zur potentiellen Tumorzelle; 2. Stimulierung der potentiellen Tumorzelle zu neoplastischem Wachstum. Nur für die erste Phase ist die Anwesenheit der Bakterien notwendig, für die zweite das Vorhandensein ausreichender Wuchsstoffmengen (Braun 1943, 1952).

Die vorstehenden Untersuchungen lassen nicht erkennen, ob in den Fällen ohne Tumorbildung bereits der erste Schritt der Umstimmung oder erst der zweite Schritt der Wachstumsstimulierung ausbleibt. Es wäre weiterer Untersuchungen wert, festzustellen, ob es hier nach Zugabe von Wuchsstoffen doch noch zur Bildung echter Tumoren kommt. Damit wäre der Nachweis erbracht, bei welcher Phase die Infektion haltgemacht hatte.

In zwei Versuchsserien ohne Tumorbildung bei den Kontrollpflanzen konnte eine Abnahme der Bakterien beobachtet werden. Dennoch fand sich 5 Tage nach der Injektion noch eine so große Zahl Bakterien in den Impfstellen (10^5), daß das Ausbleiben der Tumorbildung jedenfalls nicht mit einer zu geringen Anzahl anwesender Bakterien erklärt werden kann. Denn wie wir wissen, ist die Tumorbildung von der Zahl der Bakterien weitgehend unabhängig (Levine 1922). Sogar ein einziges virulentes Bakterium ist unter Umständen zur Auslösung der Erkrankung in der Lage (Hildebrandt 1942).

Warum manche Pflanzen trotz Besiedlung durch die Bakterien keinen Tumor bekommen, wissen wir im einzelnen nicht. Im Falle des *Ageratum mexicanum* liegt dies jedenfalls nicht an einer geschwächten Virulenz der Bakterien, denn in einem Kontrollversuch konnte festgestellt werden, daß die Bakterien nach mehrtägigem Aufenthalt in *Ageratum* an *Helianthus annuus* noch normal große Tumoren hervorrufen konnten (siehe S. 286). Antibiotische Zellinhaltsstoffe dürften in vielen Fällen die Pathogenität der Bakterien herabsetzen. Weshalb das Antibioticum des *Tropaeolum majus* nur in vitro gegen *Pseudomonas tumefaciens* wirksam ist, ist völlig unklar. Auch bei vielen anderen höheren Pflanzen, Moosen und Farnen sind Antibiotica gefunden worden (Freerksen u. Bönicke 1951). Ob auch an diesen Arten und ihren Bakteriosen ähnliche Beobachtungen wie an *Tropaeolum* gemacht werden können, müßten weitere Untersuchungen zeigen.

Zu Versuchsgruppe 3 (Entstehung der Sekundärtumoren): Braun (1941) beschreibt 2 Typen von Sekundärtumoren:

a) an Blattstielen und größeren Blattgefäßen knotige Auswüchse von Strängen, die bis in die Blattgefäße, aber meist nicht bis zum Primärtumor verfolgt werden konnten. Aus diesen Geweben gelang die Rückisolierung der Bakterien nur in ganz wenigen Fällen. Die Tumoren ließen sich in vitro nicht wie Krebsgewebe kultivieren, sondern gingen nach wenigen Wochen ein (White und Braun 1942).

Entgegen Brauns Befunden beobachtete ich kleine, knotenförmige Verdickungen an Blattstielen und großen Gefäßen auch spontan an meinen nichtinfizierten Kontrollpflanzen. Ich habe sie deshalb nicht als Sekundärtumoren werten können und auch nicht näher untersucht. Hierin mag ein Grund für die Differenz in den Angaben über die Häufigkeit der Sekundärtumoren in Brauns und diesen Untersuchungen zu finden sein.

b) Sekundärtumoren an den Abbruchstellen der unteren Blätter; sie wurden durch Vergrößerung von Holzteil und Rinde gebildet.

Diese Art Tumoren trat auch bei meinen Versuchspflanzen spontan auf oder wurde durch die experimentell gesetzten Verletzungen hervorgerufen. Sie können, wie auch eigene Versuche bestätigten, bakteriologisch steril sein und ohne Heteroauxin-Zugaben in vitro weiterwachsen.

Leider waren in der Literatur nirgends nähere Angaben zu finden, die die Häufigkeit der Sekundärtumoren nach dem ersten und zweiten Typ getrennt aufführten.

Zusammenfassung.

1. In 3 Vegetationsperioden wurden systematische Untersuchungen über den Wirtskreis von *Pseudomonas tumefaciens*, des Erregers des bakteriellen Pflanzenkrebses, angestellt.

a) 149 von 387 untersuchten Arten aus 68 Familien erkrankten mit Tumorbildung.

b) Ausbleiben der Tumorbildung bei den nichterkrankten 238 Arten ist noch kein Beweis, daß diese Arten überhaupt keinen Tumor zu bilden vermögen, denn nicht immer reagierten alle Individuen einer Art gleichsinnig.

c) Von den Arten, die in mehreren Vegetationsperioden untersucht wurden, bildeten 20% in einem Jahr einen Tumor, im anderen nicht.

d) Verwandte Pflanzengruppen (Gattungen, Familien, Ordnungen) beantworteten in zum Teil recht hohem Prozentsatz gleichartig die bakterielle Infektion mit oder ohne Tumorbildung. So erkrankten z. B. sämtliche 14 untersuchten *Solanaceen*-Arten, während sich 19 untersuchte *Papilionaceen*-Arten alle als resistent erwiesen.

2. Bei der Untersuchung der Vermehrung der Bakterien in infizierten Pflanzen wurde festgestellt:

a) Zwischen dem Verhalten der Bakterien in den infizierten Pflanzen und der Tumorbildung bestand keine gesicherte Korrelation. Zwar ging die Tumorbildung stets mit Bakterienvermehrung einher, Bakterienvermehrung fand sich aber auch oft in den Fällen, in denen es nicht zur Bildung eines Tumors kam.

b) *Tropaeolum majus* erkrankte an Krebs mit Bakterienvermehrung, obwohl nachgewiesen werden konnte, daß der aus der Pflanze hergestellte Preßsaft in vitro gegen *Pseudomonas tumefaciens* antibiotisch wirksam war.

3. Hinsichtlich der Sekundärtumorbildung wurde folgendes ermittelt:

a) Die These wurde bestätigt, daß ohne Verwundung keine Sekundärtumoren auftreten.

b) Bei weitem nicht jede Verwundung führte bei einer Pflanze mit Primärtumor zur Sekundärtumorbildung.

c) Der von amerikanischen Autoren angegebene hohe Prozentsatz von Sekundärtumoren konnte nicht bestätigt werden.

Herrn Professor Dr. Richard Harder danke ich für das Interesse, das er meiner Arbeit stets entgegengebracht hat, sowie für seine wertvollen Hinweise und die Unterstützung mit den Mitteln seines Instituts.

Literatur.

Appler, H.: Biol. Zbl. **70**, 452—469 (1951). — Braun, A. C.: Phytopath. **31**. 135—149 (1941). — Braun, A. C., und Ph. R. White: Phytopath. **33**, 85—100 (1942). — Amer. J. Bot. **30**, 674—677 (1943); **34**, 234—240 (1947). — Growth **16**, 65—79 (1952). — Dame, F.: Zbl. Bakter. II, **98**, 385—429 (1938). — Freerksen, E., u. R. Bönicke: Z. Hyg. **132**, 417—449 (1951). — Gäumann, E.: Pflanzliche Infektionslehre, 2. Aufl. Basel 1951. — Hildebrandt, E. M.: J. Agric. Res. **65**, 45—59 (1942). — Levine, M.: Phytopath. **16**, 56 (1922). — Noël, Ch. : Ann. des Sci. natur. Bot. Sér. **11**, T. 7, 87—146 (1947). — Schmidt, W.: Schweiz. Z. Hyg., Heft 2, 3—26 (1933). — Smith, Cl. O.: Phytopath. **3**, 59 (1913). — J. Agric. Res. **13**, 957 (1925). — Sorauer, P.: Handbuch der Pflanzenkrankheiten, 6. Aufl. Berlin 1928ff. — Stapp, C.: In Sorauers Handbuch der Pflanzenkrankheiten, Bd. 2 (1928). — Stapp, C., u. H. Bortels: Z. Parasitenkde. **4**, 101—125 (1931). — Naturwissenschaften **34**, 81—87 (1947). — White, Ph. R., u. A. C. Braun: Cancer Res. **2**, 597—617 (1942). — Winter, A. G., u. L. Willeke: Naturwissenschaften **39**, 236—237 (1952).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 293—322 (1954).

Sammelbericht.

(Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung in Gatersleben der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin.)

Die Rolle des molekularen Wasserstoffs im Stoffwechsel der Mikroorganismen.

Von

HANS-GÜNTER SCHLEGEL.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 17. März 1954.)

Die Beteiligung des molekularen Wasserstoffs am Stoffwechsel der Mikroorganismen, seine Oxydation durch frischen Erdboden und sein Auftreten als Endprodukt gewisser Gärungsprozesse ist schon lange bekannt (TH. DE SAUSSURE). Die Beobachtungen blieben aber auf Einzelfälle beschränkt, und im übrigen hielt man Wasserstoff für ein biologisch inertes Gas. Erst als mit tieferer Kenntnis der Stoffwechselvorgänge auf der Basis der vergleichenden Biochemie sich gewisse Zusammenhänge zwischen der Fähigkeit, molekularen H_2 aufzunehmen, bzw. zu entbinden, und anderen speziellen Stoffwechseleigenschaften anzudeuten begannen und als durch KLUYVER, KLUYVER u. DONKER, STEPHENSON und in jüngster Zeit besonders durch VAN NIEL eindringlich auf die Bedeutung dieser Forschungen zur Gewinnung eines Gesamtbildes hingewiesen wurde, rückte der gasförmige Wasserstoff allmählich in den Kreis der häufiger und vielseitig bearbeiteten Themen ein.

Die Vielzahl der im letzten Dezennium auf diesem Gebiet erschienenen Arbeiten gab Veranlassung, die wichtigsten Ergebnisse zusammenzufassen. In diesem Rahmen konnten allerdings nur einige wesentliche Entwicklungslinien herausgestellt werden. Auf eine Darstellung der Methoden und der Energetik mußte verzichtet werden. Freisetzung (Abschnitt I, S. 294) und Aufnahme (Abschnitt II, S. 303) von Wasserstoff werden gesondert behandelt; die beteiligten Organismen werden jeweils zu größeren Gruppen zusammengefaßt. Die Beziehungen zwischen H_2-Stoffwechsel und N_2-Fixierung sowie einige spezielle Fragen, die die am H_2-Stoffwechsel beteiligten Fermente betreffen, werden am Schluß im Zusammenhang erörtert.

An der Entbindung und Aufnahme des molekularen Wasserstoffs sind nach unserer heutigen Kenntnis zwei Fermente, bzw. Fermentgruppen beteiligt. Für die Freisetzung des gasförmigen Wasserstoffs, beispielsweise aus Ameisensäure, macht

man „Ameisensäure-Hydrogenlyase" verantwortlich. Diese spaltet Ameisensäure in CO_2 und H_2

$$HCOOH \rightarrow CO_2 + H_2. \quad [1]$$

Man definiert Hydrogenlyasen allgemein als Enzyme, die aus ihren Substraten molekularen Wasserstoff freimachen (Stephenson u. Woods, 1941).

Die Aufnahme und Aktivierung bewirkt ein Ferment bzw. -system, das als „Hydrogenase" bezeichnet wird.

$$H_2 \rightleftharpoons 2H \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-. \quad [2]$$

Von diesen Fermenten sind die „Dehydrogenasen" zu unterscheiden, die den von einem Substrat abgespaltenen Wasserstoff auf einen H-Acceptor übertragen. „Ameisensäure-Dehydrogenase" katalysiert z. B. folgende Reaktion.

$$HCOOH + A \rightarrow CO_2 + AH_2. \quad [3]$$

Diesen ursprünglichen Definitionen liegen einfache Nachweisreaktionen zugrunde, nach denen die in Rede stehenden Reaktionen sowohl qualitativ als auch quantitativ verfolgt werden können. Die Hydrogenlyaseaktivität wird manometrisch bestimmt, indem unter N_2- oder Edelgasatmosphäre mit Alkali im Zentralgefäß die entwickelte H_2-Menge gemessen wird. Hydrogenase macht sich im Warburg-Versuch unter H_2-Atmosphäre mit O_2 oder Methylenblau als H-Acceptor in einer Gasaufnahme bemerkbar. Ameisensäure-Dehydrogenase weist man im allgemeinen im Thunberg-Versuch nach, wobei der abgespaltene Wasserstoff auf Methylenblau als H-Acceptor und Indicator übertragen wird.

I. Die Freisetzung gasförmigen Wasserstoffs.

Seit der Entdeckung, daß bei der anaeroben bakteriellen Cellulose-Gärung (Popoff 1875) gasförmiger Wasserstoff freigesetzt wird[1], ist diese Erscheinung häufig untersucht worden. Die bis 1936 an der *Coli-Aerogenes*-Gruppe gewonnenen Ergebnisse hat Stephenson (1937) zusammengefaßt.

Der am frühesten eingehend untersuchte Vorgang einer H_2-Entbindung durch nicht wachsende, „ruhende" Zellen ist die Ameisensäurespaltung durch *Escherichia coli* und einige andere in der Darmflora beheimatete Bakterien [1]. Als Katalysator dieser einfachen Spaltungsreaktion sah man das Enzym „formic hydrogenlyase" an. Neben der Möglichkeit, daß Ameisensäure-Hydrogenlyase ein selbständiges Enzym ist, wird seit Stephenson u. Stickland (1931) noch eine zweite Annahme diskutiert, wonach die Freisetzung des molekularen Wasserstoffs als Ergebnis zweier gekoppelter Reaktionen anzusehen ist, nämlich der Dehydrierung durch Ameisensäure-Dehydrogenase [4] unter Übertragung des abgespaltenen Wasserstoffs auf einen Zwischenstoff und der Entbindung des H_2 durch Hydrogenase [5].

$$HCOOH + R \rightleftharpoons CO_2 + R\text{-}2H \quad [4]$$

$$R\text{-}2H \rightarrow R + 2H \rightarrow R + H_2. \quad [5]$$

Man kann demnach zwischen einer „Hydrogenlyasen-Theorie" und einer „Zwei-Enzym-Theorie" unterscheiden.

[1] Er findet sich allerdings in Reinkulturen nicht regelmäßig und auch nur in späteren Stadien [vgl. R. Meyer: Arch. f. Mikrobiologie **13**, 250 (1942)].

a) Hydrogenlyasen-Theorie.

Die Hauptargumente für die Existenz einer besonderen Ameisensäure-Hydrogenlyase bildeten die Befunde, daß 1. *Bact. lactis aerogenes (= Aerobacter aerogenes)* aus Ameisensäure Wasserstoff bildet, dabei zwar Ameisensäure-Dehydrogenase, aber keine Hydrogenase besitzt. 2. *Shigella dispar* Ameisensäure-Dehydrogenase und Hydrogenase besitzt, ohne aus Ameisensäure H_2 abspalten zu können. 3. auf Fleischbrühe gewachsene *E. coli*-Zellen über Ameisensäure-Dehydrogenase und Hydrogenase verfügen, aber auch keine Ameisensäure unter H_2-Entwicklung spalten können. Über diese schon 1937 von Stephenson diskutierten Ergebnisse hinaus wurden in der jüngsten Zeit weitere Belege für diese Anschauung beigebracht.

Grunberg-Manago u. Mitarbeiter (1951) stellten an Suspensionen intakter *Escherichia coli*-Zellen Hemmungsversuche mit Na-azid und Hypophosphit an. Aus der Tatsache, daß in forcierter Aerobiose gezogene Zellen überhaupt keine Hydrogenlyase-Aktivität besitzen, die Aktivitäten der Ameisensäure-Dehydrogenase und Hydrogenase aber denen der in Semi-Anaerobiose gezogenen Zellen, bei denen alle drei Enzymaktivitäten optimal sind, nicht nachstehen und aus dem unterschiedlichen Verhalten gegenüber den beiden Hemmstoffen konnte gefolgert werden, daß Ameisensäure-Hydrogenlyase ein bestimmtes selbständiges Enzym sein muß.

Lichstein u. Boyd (1953) untersuchten die Förderung der drei Enzymaktivitäten (Ameisensäure-Hydrogenlyase, Ameisensäure-Dehydrogenase und Hydrogenase) von forciert aerob und semi-anaerob gezüchteten Zellen von *Aerobacter aerogenes* durch Ölsäure und Hefeextrakt. Ihre Ergebnisse sprechen ebenfalls für die Eigenständigkeit der Ameisensäure-Hydrogenlyase bzw. eines Hydrogenlyase-Systems.

Die Frage, ob es außer einer speziell auf Ameisensäure als Substrat angewiesenen Hydrogenlyase noch weitere Hydrogenlyasen gibt, ist auch bereits von Stephenson (1937) diskutiert worden. Da aus den meisten Substanzen, aus denen bei Bakteriengärungen H_2 freigesetzt werden kann, auch Ameisensäure entsteht, wurde eine Zeitlang Ameisensäure generell als Vorstufe des Wasserstoffs angesehen. Doch wiesen schon eine ganze Anzahl von Befunden an *E. coli* (Stephenson u. Stickland, 1932) darauf hin, daß die H_2-Entbindung aus Glucose auch einen anderen Weg beschreiten kann als den über HCOOH. Die Annahme, daß Ameisensäure bei der Wasserstoffentbindung als Intermediärprodukt auftritt, erscheint im Falle der Glucosegärung noch am plausibelsten. In der Folgezeit sind aber eine Anzahl von Untersuchungen veröffentlicht worden, die für die Existenz einer ganzen Reihe von wasserstoffentwickelnden Enzymen sprechen.

An der Gasbildung im Zuge der anaeroben Zersetzung von Kohlenhydraten sind in erster Linie *Clostridien* wie *Cl. butyricum*, *Cl. acetobutylicum*, *Cl. butylicum* und *Cl. propionicum* beteiligt, deren Namen jeweils das Hauptgärungsprodukt bezeichnen. Diese Sporenbildner können durchweg eine ganze Reihe von Substraten nutzen. Bei *Cl. tetanomorphum* findet beispielsweise mit Glucose, Brenztraubensäure, Äpfelsäure, Fumarsäure, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Serin, Cystein, Histidin, Methionin und Tyrosin als Substrat eine H_2-Entwicklung statt (Woods u. Clifton 1937). Die Vorstufe, aus der H_2 schließlich abgespalten wird, blieb dabei unbekannt. Die Tatsache, daß die Aminosäuren, aus denen kein H_2 gebildet wurde, überhaupt nicht angegriffen wurden, weist darauf hin, daß die Hydrogenlyasefunktion in diesem Falle nicht eine nur gelegentliche Nebenreaktion ist. Da Ameisensäure nicht angegriffen wurde, hält man das Enzym für nicht identisch mit der Ameisensäure-Hydrogenlyase. Ebensowenig vermag *Cl. butyricum*, das aus Brenztraubensäure H_2 freisetzt, Ameisensäure zu spalten (Brown, Osborn u. Werkman 1934).

Die Bildung von Buttersäure und Gas im Zuge der Glucosevergärung durch *Cl. butyricum* nach

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow C_4H_8O_2 + 2CO_2 + 2H_2 \qquad [6]$$

wurde von Kubowitz (1934) untersucht, nachdem Kempner (1933) ihre CO-Hemmbarkeit entdeckt hatte. Die Reversibilität der Hemmung durch Kohlenmonoxyd im Licht schien anzudeuten, daß das wasserstoffentwickelnde Gärungsferment zu den Fe-Porphyrin-Körpern zählt. Aus einer photochemischen Analyse folgte jedoch, „daß das wasserstoffentwickelnde Gärungsferment keine Häminverbindung sein kann" (Warburg 1948). Über die Bindung des Eisens sowie seine Rolle während der H_2-Freisetzung kann noch nichts ausgesagt werden.

Weiter beobachtete Kubowitz (1934), daß nicht nur Kohlenmonoxyd sondern auch H_2 die Gasbildung herabzusetzen vermag und die Gärung dabei in eine nahezu reine Milchsäuregärung übergeht:

$$\text{Glucose} \rightarrow \text{Spaltungsprodukte} \begin{cases} \nearrow \text{Milchsäure} \\ \searrow \text{Buttersäure} + CO_2 + H_2. \end{cases}$$

Die Spaltung der Brenztraubensäure nach

$$CH_3 \cdot CO \cdot COOH + H_2O \longrightarrow CH_3 \cdot COOH + CO_2 + H_2 \qquad [7]$$

wird ebenfalls durch CO oder H_2 gehemmt.

Hinsichtlich einer ausgeprägten Abhängigkeit der H_2-Entbindung vom H_2-Partialdruck der überstehenden Atmosphäre ist *Diplococcus glycinophilus* bemerkenswert (Cardon u. Barker 1947). Dieser Organismus vergärt Glykokoll unter Bildung von Essigsäure, CO_2, NH_3 und H_2. Enthält die überstehende Atmosphäre mehr als 25% H_2, so wird die H_2-Entwicklung völlig unterdrückt. Diese Abhängigkeit vom Partialdruck

weist darauf hin, daß ein vollkommen reversibles Gleichgewicht der Art $AH_2 \rightleftharpoons A + H_2$ vorliegt, wobei höchstwahrscheinlich ein H-Acceptor B um den H_2 konkurriert:

$$AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2 \rightleftharpoons A + B + H_2.$$

Auch bei der Glykokollspaltung können weder Ameisensäure noch Brenztraubensäure unmittelbare Vorstufen der H_2-Abspaltung sein, da erstere gar nicht, letztere nur sehr langsam umgesetzt wird. Diese an verschiedenen Organismen gewonnenen Ergebnisse lassen sich nicht mit der Annahme in Einklang bringen, daß es nur ein einziges wasserstoffentwickelndes Ferment gibt, wenn man nicht eine bisher unbekannte gemeinsame Vorstufe auf dem Wege der Wasserstoff-Entbindung postulieren wollte. Andererseits reichen die dargelegten Befunde noch nicht aus, die Existenz einer Mehrzahl von Hydrogenlyasen zu belegen.

Hält man aber an der Vorstellung fest, daß der Mechanismus ein einheitlicher ist, so bestünden zwei Möglichkeiten der Erklärung, die als heuristische Prinzipien aufgefaßt werden können. Die eine, nach der Hydrogenase in einer reversiblen Reaktion neben der H_2-Aktivierung auch die H_2-Entbindung bewirkt, wird im nächsten Abschnitt diskutiert. Nimmt man hingegen an, daß es eine selbständige Hydrogenlyase gibt, so könnte man in einer „aktivierten Ameisensäure" (Rauen u. Jaenicke 1953) die allen zur H_2-Entwicklung befähigten Organismen gemeinsame Vorstufe des molekularen Wasserstoffs sehen.

b) „Zwei-Enzym-Theorie".

Das Problem, ob die H_2-Entwicklung aus Ameisensäure durch eine Hydrogenlyase oder zwei kombinierte Fermente bewirkt wird, das nach der Zusammenfassung von Stephenson (1937) bereits zugunsten der „Ein-Enzym-Theorie" diskutiert worden ist, haben im Zusammenhang mit anderen Fragestellungen Ordal u. Halvorson (1939) wieder aufgegriffen. Sie verglichen die Wasserstoffbildung aus Zuckern (Glucose, Maltose) und Ameisensäure und kamen zu der Folgerung, daß Ameisensäure ein Abbauprodukt der Zucker ist und die Gasentwicklung letztlich der Spaltung der Ameisensäure zuzuschreiben ist. Hydrogenase und Ameisensäure-Dehydrogenase sollen Bestandteile der Ameisensäure-Hydrogenlyase sein. Die Erscheinung, daß beim Vorhandensein sowohl von Ameisensäure-Dehydrogenase als auch von Hydrogenase in manchen Fällen dennoch aus Ameisensäure kein CO_2 und H_2 entwickelt wird, führen die Autoren auf das Fehlen eines die „Elektronenübertragung" zwischen beiden Enzymen vermittelnden Faktors zurück. In die gleiche Richtung schlägt die Beobachtung (de Ley 1951), daß bei *E. coli*-Zellen, die auf Medien verschiedenen N-Gehaltes gezogen waren, bei zunehmendem N-Mangel die Aktivität der Ameisensäure-Hydrogenlyase parallel mit der der Hydrogenase zurückgeht.

Waring u. Werkman (1942) beobachteten an *Aerobacter indologenes*, daß der Entzug von Eisen (Wachstum in Eisen-Mangel-Kultur) die Hydrogenase-Aktivität ebenso herabsetzte wie die Fähigkeit zur H_2-Entbindung. Es benötigten also beide Enzyme zu ihrer vollen Aktivität Eisen. Diese und andere Beobachtungen führten erneut zu der Vorstellung von der H_2-Bildung als einer kombinierten Wirkung von Ameisensäure-Dehydrogenase und Hydrogenase. Bemerkenswert ist, daß unter forcierter Belüftung gezogene Zellen keine Herabsetzung der Hydrogenase- und Ameisensäure-Hydrogenlyase-Aktivität zeigten. Hinsichtlich der Fe-Bedürftigkeit bestätigten diese Ergebnisse Untersuchungen an *Clostridium welchii* (Pappenheimer u. Shaskan 1944). Dieser Organismus vergärt Glucose normalerweise zu Milchsäure, Essigsäure, Spuren Buttersäure, Äthanol, CO_2 und H_2, bildet aber unter CO oder nach Eisenmangelkultur fast ausschließlich Milchsäure.

Eine teilweise Klärung, aber auch eine Erweiterung erfuhren die aufgeworfenen Fragen durch die Arbeiten mit zellfreien Extrakten von *E. coli* (Gest u. Gibbs 1951, Gest 1953). Solche Extrakte wurden nach der Alumina-Methode (Reiben mit Aluminiumoxyd „Alumina A 303" von Hand im Mörser nach McIlwain 1948) aus anaerob und forciert aerob kultivierten *E. coli* hergestellt und fraktioniert zentrifugiert. Das Überstehende einer ersten Zentrifugation mit 16000 U/min für 15 min wurde durch nochmaliges einstündiges Zentrifugieren mit 20000 U/min in eine Extrakt-Fraktion und eine Partikelfraktion getrennt. Konzentrierter Extrakt anaerob gewachsener Zellen spaltet Ameisensäure in CO_2 und H_2. Der Extrakt aus forciert aerob herangewachsenen Zellen wies eine stark herabgesetzte Ameisensäure-Hydrogenlyase, aber normale Ameisensäure-Dehydrogenase-Aktivität auf. Gest gelang es nun, durch Zusammenfügen von hydrogenasehaltigem, verdünntem Extrakt anaerob gewachsener Zellen (also mit Hydrogenase-, aber ohne Hydrogenlyase-Aktivität) und der Ameisensäure-Dehydrogenase enthaltenden Partikelfraktion aerob gezogener Zellen das Hydrogenlyasesystem zu rekonstruieren (Abb. 1). Während frische Partikel anaerob gewachsener Zellen sowohl Ameisensäure-Dehydrogenase- und Hydrogenase-, als auch Ameisensäure-Hydrogenlyase-Aktivität besitzen, fehlt letztere in vier Tage alten Teilchen. Dieser Effekt wird mit dem Vorhandensein labiler Faktoren gedeutet, die den Elektronentransport zwischen Ameisensäure-Dehydrogenase und Hydrogenase bewirken.

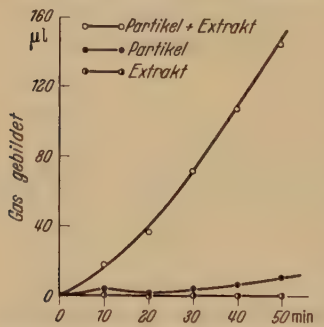


Abb. 1. „Rekonstruktion" des Hydrogenlyase-Systems aus „aeroben" Teilchen und „anaerobem" Extrakt (aus H. Gest 1953).

Gibt man Extraktfraktion zu den gealterten inaktiven Partikelchen, so wird die Ameisensäure-Hydrogenlyasefunktion sofort aktiviert. Die Aktivität an Ameisensäure-Hydrogenlyase eines durch Ammonsulfatfällung aus dem Extrakt erhaltenen Niederschlages läßt sich durch Zugabe von Cocarboxylase, Diacetyl oder gekochtem *E. coli*-Extrakt in zunehmendem Maße wieder herstellen. Es wird vermutet, daß der intermediäre Faktor, den auch schon Lascelles (1948) auf Grund ihrer Experimente mit ruhenden *E. coli*-Zellen forderte, Diacetyl oder Brenztraubensäure und Cocarboxylase ist.

Wenn diese Untersuchung auch noch nicht als Lösung des Hydrogenlyase-Problems anzusehen ist, so kann doch abschließend gesagt werden, daß der Vorgang der „Ameisensäurespaltung" viel komplexerer Natur ist als bisher angenommen wurde, und die Abspaltung von CO_2 und H_2 möglicherweise auch in einem Cyclus vor sich geht.

Mit dieser Annahme würden aber auch viele Arbeiten an Gewicht verlieren, die auf indirektem Wege die Existenz einer selbständigen Hydrogenlyase beweisen wollten. Und nach wie vor bleibt die Frage zu klären, ob der letzte fermentative Schritt zur Freisetzung des Wasserstoffs eines besonderen Enzyms, eines wasserstoffentwickelnden Fermentes, bedarf oder eine reversible Hydrogenase-Reaktion darstellt (Hobermann u. Rittenberg 1943). Die geschilderten Ergebnisse lassen sich aber ebensogut in die Vorstellung einfügen, daß für die H_2-Entbindung ein Enzym verantwortlich zu machen ist, das nicht Hydrogenase zu sein braucht, und dessen wirkungsspezifische Gruppe mit verschiedenen Apoenzymen gekoppelt werden kann, die die Substratspezifität bedingen. So lange diese Fragen nicht mit Fermentpräparaten einer Lösung näher gebracht worden sind, erübrigen sich auch alle Diskussionen über die Natur, Konstitution und mögliche Cofaktoren dieses Fermentes, die an Hand einer Reihe von Ergebnissen anzustellen wären (Kubowitz 1934, Waring u. Werkman 1944, Warburg 1948, Lichstein u. Boyd 1951).

c) „Photoproduktion" von Wasserstoff.

1938 entdeckte Nakamura die Bildung von Wasserstoff durch *Rhodobacillus palustris* aus Ameisensäure und Glucose, die im Dunkeln in N_2-Atmosphäre vor sich geht. Heute weiß man von mehreren Stämmen der *Thio-* und *Athiorhodaceen* (Gest, Kamen u. Bregoff 1950), daß sie im Dunkeln Ameisensäure, Glucose, Glycerinphosphat, Brenztraubensäure oder endogene Reserven in N_2-Atmosphäre unter Bildung gasförmigen Wasserstoffs zersetzen können. Es handelt sich dabei höchstwahrscheinlich um den gleichen oder einen ähnlichen Vorgang einer „Hydrogenlyase-Reaktion", wie sie in den vorangehenden Abschnitten geschildert worden ist.

Wohl zu unterscheiden von dieser H_2-Bildung der Purpurbakterien im Dunkeln ist die H_2-Produktion im Licht, zu deren Bezeichnung die Entdecker den neuen Terminus „Photoproduktion" (von Wasserstoff) einführten, der hier übernommen wird. Das Hauptsubstrat dieser Photoproduktion von Wasserstoff ist DL-Äpfelsäure; und schon die Tatsache, daß gewisse oxydierte Substrate wie Äpfelsäure im Dunkeln unter N_2 nicht zersetzt werden können, grenzt beide Prozesse klar voneinander ab und läßt auf eine grundsätzliche Verschiedenheit beider Mechanismen schließen.

Die Photoproduktion von gasförmigem Wasserstoff wurde 1948 von Gest u. Kamen (1949) entdeckt. Sie beobachteten an Glasstöpselflaschen, die mit einer außer Mineralsalzen DL-Äpfelsäure, Citronensäure, L-Glutaminsäure, Biotin und Difco-Hefe-Extrakt enthaltenden Nährlösung gefüllt und mit *Rhodospirillum rubrum* beimpft waren, eine Entwicklung von CO_2 und H_2. In Form gewaschener Suspensionen entfaltete dieser Organismus im Warburg-Versuch mit Äpfelsäure als H-Donator im Licht und unter Edelgasatmosphäre dieselbe Fähigkeit. Die Entdeckung war um so überraschender als vom selben Objekt bereits die Fähigkeit zur Photoreduktion von CO_2 mittels H_2 bekannt war. Unter reinem H_2 fand die H_2-Entwicklung wie unter He statt und wurde auch durch geringe O_2-Mengen (2,5%) nicht gestört. Auch diese Feststellung kam angesichts der Hemmung der H_2-Produktion von *Diplococcus glycinophilus* und *E. coli* (Cardon u. Barker 1947, Gest 1952) unter H_2-Atmosphäre völlig unerwartet. Ebensowenig vorherzusehen war die Erscheinung, daß sich N_2 nicht wie ein inertes Gas verhielt, sondern — schon bei einem N_2-Gehalt der überstehenden Atmosphäre von 20% — die Photoproduktion von H_2 völlig unterdrückte. Die CO_2-Ausscheidung geht dabei weiter und ist der verbrauchten Äpfelsäure völlig äquivalent. Der Zusatz von Ammonsalz hatte die gleiche Wirkung wie N_2. Die Hemmung durch N_2, bzw. NH_4Cl ist nach deren Entfernung bzw. Aufbrauch sofort reversibel. Mit isotopem $^{15}N_2$ konnte nachgewiesen werden, daß unter den gegebenen Bedingungen eine N_2-Fixierung erfolgt, die durch gleichzeitig anwesendes NH_3 gehemmt wird. Als H-Donatoren sind außer DL-, L- und D-Äpfelsäure von 28 durchgeprüften Zuckern, Fettsäuren, Aminosäuren und Alkoholen nur Oxalessigsäure, Fumarsäure und Brenztraubensäure geeignet. Bernsteinsäure wird nur in Gegenwart von L-Glutaminsäure verwertet.

Eine Nachuntersuchung mit *Rhodopseudomonas gelatinosa* und *Rhodospirillum rubrum* als Versuchsobjekten (Siegel u. Kamen 1951) führte zu analogen Ergebnissen. Doch können außer den genannten zusätzlich Essigsäure, Acetessigsäure und Aceton genutzt werden. Ammonsalz und N_2 hemmen die Photoproduktion, üben jedoch auf die Photoreduktion von CO_2 mittels H_2 keine Hemmung aus.

Die neben H_2 und CO_2 aus Brenztraubensäure im Dunkeln entstehenden Nebenprodukte sind Essigsäure, Buttersäure, Propionsäure, Valeriansäure und andere (Kohlmiller u. Gest 1951). Im Licht (Photoproduktion) treten keine Fettsäuren auf, sondern nur H_2 und CO_2 in äquimolekularen Mengen. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen über dieses Problem (Gest u. Kamen, Siegel u. Kamen) wurde während des anaeroben Wachstums auf Malat-Glutamat-Nährlösung im Licht Anhäufung von Ameisensäure beobachtet. Mit der Hemmung der H_2-Bildung durch Ammonchlorid wurde auch die Anhäufung von Ameisensäure unterbunden. Von anderer Seite wurde noch NH_2OH als Hemmstoff der Photoproduktion hinzugefügt (Morita, Suzuki u. Takashima 1951). Die Ergebnisse des amerikanischen Arbeitskreises konnten durch den japanischen weitgehend bestätigt werden.

Die von zwei Stellen (Bregoff u. Kamen 1952, Newton u. Wilson 1953) unabhängig voneinander durchgeführte Prüfung von *Chromatium (Thiorhodaceae)* auf die Fähigkeit der Photoproduktion von H_2 ließ ein grundsätzlich gleichartiges Verhalten erkennen. Nach Newton u. Wilson entwickelten die von ihnen benutzten drei Stämme allerdings nur dann Wasserstoff, wenn außer Malat zusätzlich Bicarbonat oder CO_2 vorhanden war. N_2 und NH_4Cl unterdrückten die H_2-Photoproduktion gleichermaßen. Die Vorkultur in ammoniakhaltiger Nährlösung war hingegen ohne Einfluß. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß bereits Roelofsen (1934) an Thiorhodobakterien, die auf peptonhaltigem Medium gezogen worden waren, eine H_2-Entwicklung sowohl im Dunkeln als auch im Licht beobachtete, dieses Phänomen aber als Folge eines Autolysevorganges ansah.

Für das Verständnis der Photoproduktion von H_2 ist das Auftreten von Ameisensäure (Kohlmiller u. Gest) im Zuge des Abbaues der Äpfelsäure von außerordentlicher Bedeutung, weshalb diese Frage nochmals untersucht werden sollte. Ein von Gest, Kamen u. Bregoff (1952) gegebenes Reaktionsschema zugrunde legend, könnte man dann annehmen, daß die Äpfelsäure durch das photoaktivierte Wasser teilweise reduziert, teilweise zu Ameisensäure oxydiert wird, welch letztere in einer Ameisensäure-Hydrogenlyase-Reaktion zur H_2-Bildung führte. Unverständlich bliebe aber doch die Tatsache, daß H_2-Atmosphäre die Photoproduktion nicht hemmt, zumal dieses Verhalten bei Heterotrophen ausnahmslos zu gelten scheint und vor kurzem erst wieder bei *Cl. pasteurianum* bestätigt worden ist (Mortensen u. Wilson 1951). Die Hemmung durch N_2 erscheint in Anbetracht der Fähigkeit zur N_2-Bindung und unter der Annahme, daß der erste Fixationsschritt ein reduktiver ist, verständlich; die gleichsinnige Wirkung von NH_3 bleibt unter dieser Perspektive aber noch rätselhaft.

d) Die Photoproduktion von Wasserstoff durch Grünalgen.

Gelegentlich ihrer Untersuchungen über die Photoreduktion von CO_2 mittels H_2 durch *Scenedesmus* fanden Gaffron u. Rubin (1942), daß diese Grünalge unter bestimmten Bedingungen auch gasförmigen Wasserstoff abscheiden kann. Diese Wasserstoffgärung im Dunkeln hat viel Ähnlichkeit mit der Gärung durch heterotrophe Bakterien. Wird *Scenedesmus* eine Zeitlang (2 Std) anaerob unter N_2 gehalten, so setzt allmählich eine Abscheidung von H_2 ein. Als H-Donatoren fungieren dabei höchstwahrscheinlich zelleigene Reservestoffe; Glucosezusatz fördert die H_2-Entbindung, doch waren quantitative Beziehungen zwischen Glucoseverbrauch, H_2-Produktion und Milchsäurebildung (Hauptgärungsprodukt) nicht zu ermitteln. Belichtung der gärenden Algen steigert die H_2-Produktion, besonders wenn CO_2 und H_2 nicht anwesend sind, auf das Zehnfache. Auch diese Photoproduktion wird durch Glucosezusatz gesteigert. Dinitrophenol ($6 \cdot 10^{-4}$ m) hemmt die H_2-Entwicklung im Dunkeln in hohem Maße, während es die Photoproduktion fördert. Es verhindert vermutlich die Übertragung von Wasserstoff auf CO_2. Auch CO trennt die Mechanismen der H_2-Entwicklung im Dunkeln und im Licht. Da es die Photoreduktion von CO_2 mittels H_2 vollständig hemmt, läßt es den gegenläufigen Prozeß der Photoproduktion von H_2 stärker in Erscheinung treten. Aus diesen Versuchen ziehen die Verfasser den Schluß, daß *Scenedesmus* eine Hydrogenase besitzt, die abhängig vom Potential des wasserstoffübertragenden Systems der Zelle und vom p_{H_2} der Atmosphäre entweder die Aufnahme oder die Entbindung von molekularem Wasserstoff katalysiert.

An *Chlamydomonas moewusii* wurden diese Ergebnisse durch Frenkel (1952) bestätigt. Die Adaptation und Umschaltung auf den anaeroben Stoffwechsel erfolgt schon nach kürzerer Zeit als bei *Scenedesmus*. Daß der abgeschiedene Wasserstoff nicht dem Wasser, sondern endogenen H-Donatoren entstammt, zeigten Versuche mit D_2O (Kamen u. Gest, 1952). Die H_2-Entwicklung der bisher untersuchten Grünalgen unterscheidet sich von der der Purpurbakterien wesentlich und scheint der der heterotrophen Bakterien näher zu stehen. Gemeinsam mit den heterotrophen Bakterien ist ihr im Gegensatz zu den Purpurbakterien die Hemmung durch das Reaktionsprodukt Wasserstoff und die Unwirksamkeit von N_2 und NH_4Cl. Eine einzigartige Stellung unter den bisher betrachteten Fällen geben dieser Art der H_2-Entwicklung die Tatsachen, daß organische H-Donatoren kaum eine Rolle spielen, die Mechanismen im Licht und im Dunkeln vermutlich verschieden und nur bei einer gewissen niederen Beleuchtungsstärke unterhalb des Kompensationspunktes funktionsfähig sind.

II. Die Verwertung gasförmigen Wasserstoffs.

a) Chemoautotrophe, fakultativ heterotrophe Bakterien (Knallgasbakterien).

Unsere erste Kenntnis von einer Verwertung des gasförmigen Wasserstoffs geht auf Th. de Saussure zurück, der 1838 eine Wasserstoffoxydation durch feuchte Erde und andere fermentierende Substanzen beobachtete. Da Trocknen und Glühen der Erde, sowie der Zusatz antiseptisch wirkender Mittel (wie 25% Salz, 1% Schwefelsäure) die Knallgaskondensation verhinderten, führte er das Phänomen auf die Tätigkeit von Bodenorganismen zurück. Obwohl dieser Versuch durch Liebigs Agrikulturchemie allgemein bekannt geworden sein dürfte, hat Immendorf (1892) die gleiche Beobachtung von neuem gemacht. Kaserer (1906) und Niklewski (1906) waren dann die ersten, die sich mit der Isolierung der „Knallgasbakterien" beschäftigten. Kaserer zog aus Ackererde 2 morphologisch und physiologisch verschiedene Organismen, von denen er einen, *Bacillus pantotrophus*, näher charakterisierte.

Die Untersuchungen dieser Jahre waren in erster Linie auf die Ermittlung optimaler Kulturbedingungen für auto- und heterotrophe Lebensweise und die Beschreibung neuer Formen abgestellt und sind im wesentlichen von Kaserer (1906a, b), Nabokich u. Lebedeff (1907) sowie Niklewski (1908, 1910, 1914) betrieben worden.

Als man einmal erkannt hatte, daß die wasserstoffoxydierenden Bakterien unter streng autotrophen Bedingungen mit H_2 als Energie- und CO_2 als einziger Kohlenstoffquelle gedeihen können, und folglich die Annahme nahe lag, daß Wasserstoff
nach $2\,H_2 + O_2 \rightarrow 2\,H_2O$ verbrannt und Kohlendioxyd etwa
nach $2\,H_2 + CO_2 \rightarrow CH_2O + H_2O$ reduziert wird, mußte diese Bakteriengruppe als ideales Objekt für quantitative Versuche zur Ermittlung des energetischen Nutzungsquotienten der CO_2-Assimilation die Thermodynamiker unter den Physiologen zur Untersuchung geradezu herausfordern. Einen H_2/O_2-Quotienten von 2,11 und ein CO_2/Knallgas-Verhältnis von 1:13,2 während 19tägiger Kulturdauer ermittelte bereits Lebedeff (1908, 1909). Dieses Problem wurde dann in der klassischen Arbeit von Ruhland (1924) mit *Bacillus pycnoticus* sehr sorgfältig und auf breiter Basis bearbeitet. Seine Ergebnisse sind in zahlreiche Abhandlungen und Werke über den energetischen Wirkungsgrad biologischer Synthesen (Burk, 1931, Stern, 1933, Rippel, 1952, u. a.) eingegangen und Gegenstand der Diskussion über Enthalpie und freie Energie im Stoffwechselgeschehen geworden.

Die weite Verbreitung der Knallgasbakterien und die Fähigkeit zur Oxydation des molekularen Wasserstoffs unter den Vertretern ganz verschiedener Bakteriengruppen stellte dann Grohmann (1924) heraus. Mit

dieser in erster Linie systematisch orientierten Arbeit fanden diese grundlegenden Untersuchungen ihren vorläufigen Abschluß.

In Anbetracht der vom letztgenannten Autor mitgeteilten entmutigenden Schwierigkeiten, die bei der Kultur der Knallgasbakterien plötzlich aufgetaucht waren und auf eine Bakteriophageninfektion zurückzuführen sein dürften (Schatz u. Bovell, 1952), nimmt es nicht wunder, daß mit dem Hervortreten biochemischer und enzymatischer Fragestellungen die weitere Forschung sich nicht der Knallgasbakterien als Versuchsobjekte bediente, sondern gewisser Vertreter der *Coli-Aerogenes*-Gruppe, an denen die Fähigkeit zur Verwertung des molekularen Wasserstoffs viel später entdeckt worden war (siehe nächsten Abschnitt).

So entstand die nächste Arbeit über Knallgasbakterien bezeichnenderweise nicht auf Grund einer theoretischen Fragestellung, sondern entstammt der gelegentlichen Beobachtung, daß in einer Sandkultur von Leguminosen unter einer H_2-Luft-Atmosphäre Gas verschwand (Lee u. Umbreit, 1940).

Unter dem Aspekt der vergleichenden Biochemie der chemo-autotrophen Mikroorganismen beschäftigten sich Kluyver u. Manten (1942) insbesondere mit den Beziehungen zwischen auto- und heterotropher Lebensweise. Wie sich herausstellte, sind heterotroph gezogene Zellen von *Hydrogenomonas flava* (Niklewski) nicht imstande, H_2 zu aktivieren und zu oxydieren, womit auch Ruhlands Beobachtung, daß bei heterotropher Kultur keine H_2-Aufnahme erfolgt, eine plausible Erklärung findet. Hingegen vermögen autotroph gezogene Zellen sowohl H_2 als auch Milchsäure zu oxydieren. Sind beide H-Donatoren zugleich vorhanden, so entspricht die Gasaufnahme der Summe der bei getrennter Verabfolgung der H-Donatoren nebeneinander gemessenen Werte und übersteigt sie unter gewissen Bedingungen sogar noch. H_2-Oxydation und normaler Atmungsprozeß scheinen also auf 2 unabhängigen Wegen nebeneinander herzulaufen.

Unter reiner H_2/CO_2-Atmosphäre findet keine Gasaufnahme statt, wie nach den von Kaserer (1906) hypothetisch aufgestellten Gleichungen [8 und 9] zu erwarten gewesen wäre.

$$H_2CO_3 + 2H_2 \rightarrow CH_2O + 2H_2O + 6\ \text{Cal} \quad [8]$$

$$CH_2O + O_2 \rightarrow H_2CO_3 + 132\ \text{Cal}. \quad [9]$$

Kaserer lehnte demnach eine direkte Oxydation des Sauerstoffs ab. Im Gegensatz zu ihm nahm Ruhland an, daß die Vorgänge [10] bis [12] nebeneinander herlaufen und

$$H_2 + {}^1/_2O_2 \rightarrow H_2O + 69\ \text{Cal} \quad [10]$$

$$CO_2 + H_2O \rightarrow CH_2O + O_2 - 112\ \text{Cal} \quad [11]$$

$$CH_2O + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O + 112\ \text{Cal} \quad [12]$$

[10] und [11] miteinander energetisch gekoppelt sind, wobei [10] unter

bestimmten Verhältnissen (N-Mangel) auch als „Leerlaufreaktion" fortschreiten kann.

Mit der gleichen Fragestellung wandten sich Schatz u. Bovell (1952) den Knallgasbakterien zu und isolierten einen Stamm, dessen „leichte" Handhabung in der Benennung *Hydrogenomonas „facilis"* zum Ausdruck gebracht werden soll. Dieser Organismus unterscheidet sich in seinem Verhalten wesentlich von *Hydrogenomonas flava*. Seine autotrophe Wachstumsfähigkeit und seine Hydrogenaseaktivität erwiesen sich als sehr stabil und gingen selbst nach 39maliger Übertragung auf heterotrophem Nährboden mit organischen Kohlenstoffquellen nicht verloren. Die heterotroph gewachsenen Zellen oxydierten Wasserstoff ohne Adaptationsperiode, wenn auch der Q_{H_2} gegenüber den autotroph gewachsenen auf den vierten Teil abgesunken war. Als H-Acceptoren konnten außer Sauerstoff Methylenblau und Nitrat fungieren. Von anderer Seite (Wilson, Stout, Powelson u. Koffler, 1953) an einem als *Hydrogenomonas facilis* identifizierten Knallgasbakterium angestellte Untersuchungen führten diese Fragestellung einer Klärung näher. Sowohl autotroph als auch auf einem Milchsäure enthaltenden Medium gewachsene Organismen oxydierten Wasserstoff und Milchsäure gleichzeitig. Allerdings war die Hydrogenasefunktion herabgesetzt, im Falle der heterotroph gewachsenen Zellen sogar ausgeschaltet, wenn das Wachstum unter eine Atmosphäre von mehr als 5% O_2-Gehalt erfolgte. An Organismen, die unter $H_2/5\%O_2$-Atmosphäre auf einem lactathaltigen Medium gezogen worden waren, konnte bei Anwesenheit beider H-Donatoren sogar eine Stimulation der Gasaufnahme festgestellt werden. Die gleichzeitige Anwesenheit beider H-Donatoren führte zu einer Gasaufnahme, die sich additiv aus den bei getrennter Verabfolgung beobachteten zusammensetzte.

Untersuchungen an autotroph gewachsenen ($70\%H_2/20\%O_2/10\%CO_2$) ruhenden Zellen von *Hydrogenomonas* spec. hatten gezeigt, daß Methylenblau den Knallgasumsatz fördert. Die Ursache dieser Erscheinung ist mit Warburg in einem Überwiegen der wasserstoffübertragenden Fermente über die sauerstoffaktivierenden zu sehen, so daß das Cytochromoxydase-Cytochrom-System durch den aktivierten Wasserstoff ohnehin ausgelastet sein dürfte (Schlegel, 1953). Während der H_2-Oxydation zugesetzte Milchsäure hatte auch eher eine Herabsetzung als eine Steigerung der Gasaufnahme zur Folge. An Zellen, die eine Zeitlang (10 Std) an der Luft geschüttelt worden waren und deren H_2-aktivierendes System dadurch teilweise inaktiviert worden war, führte die Zugabe von Milchsäure als eines zusätzlichen H-Donators zu einer Steigerung der Gasaufnahme, die wie bei *Hydrogenomonas flava* der Summe der bei getrennter Verabfolgung der H-Donatoren entsprach. Bei jungen Zellen ist also genügend Hydrogenase vorhanden, um das sauerstoffaktivierende

System völlig auszulasten. Normalerweise ist letzteres der umsatzbegrenzende Faktor. (Schlegel, unveröffentlichte Ergebnisse.) Ob die Potenzen bei *Hydrogenomonas facilis* und dem von uns untersuchten Stamm im großen und ganzen die gleichen sind und die Differenzen in den Ergebnissen nur in einer quantitativen Verschiebung des Verhältnisses von Hydrogenase, Dehydrogenasen und dem Cytochromoxydase-Cytochrom-System auf Grund verschiedener Kulturbedingungen zu sehen ist, muß noch entschieden werden.

Nach einer originellen Modifikation der Warburg-Technik wurde von Schatz (1952) die gleichzeitige Aufnahme von CO_2, H_2 und O_2 durch ruhende Zellen von *Hydrogenomonas facilis* gemessen. Die gewonnenen Werte lassen den Vorgang der CO_2-Assimilation unter H_2-Oxydation durch folgende Gleichungen wiedergeben:

$$\begin{aligned} 4\,H_2 + 2\,O_2 &\rightarrow 4\,H_2O \\ 2\,H_2 + CO_2 &\rightarrow H_2O + (CH_2O) \\ \hline 6\,H_2 + 2\,O_2 + CO_2 &\rightarrow 5\,H_2O + (CH_2O). \end{aligned} \qquad [13]$$

Der aus diesen Angaben ($H_2/CO_2 = 6$) berechenbare Wirkungsgrad ist größer als der aus den Untersuchungen von Ruhland ($H_2/CO_2 = 7$ bis 8) berechnete. Die Differenz ist in erster Linie darauf zurückzuführen, daß Schatz seine Messungen an jungen Zellen vornahm, während die Werte von Ruhland auf Grund von Kulturversuchen bis zu einer Dauer von 19 Tagen bestimmt wurden und somit eine gewisse „Leerlaufreaktion" mit einbezogen worden sein kann. Auf die interessanten energetischen Zusammenhänge, Diskussion der Teilprozesse und die Leerlauf-Reaktion kann in diesem Rahmen nicht eingegangen werden (siehe Rippel, 1952).

b) Obligat heterotrophe Bakterien.

Die Entdeckung der H_2-Aufnahme und -Verwertung durch heterotrophe Bakterien erfolgte in einer Zeit (Tauss u. Donath, 1930, Stephenson u. Stickland, 1931), in der die von Kluyver vertretene Konzeption der „Einheit in der Biochemie" der vergleichenden Biochemie eine zentrale Stellung in der Mikrobiologie angewiesen hatte und durch mannigfaltige Anregungen die Forschung auf diesem Gebiete hervorragend befruchtete. Außerdem war die Enzymologie mit der Herstellung kristallisierter Fermente in ein neues Stadium getreten. Es ist daher zu verstehen, daß die Untersuchungen über die Rolle des gasförmigen Wasserstoffs schnell über rein physiologische Fragestellungen hinauswuchsen und auf die Aufklärung von Fermentprozessen abzielten.

Bei ihren Untersuchungen über kohlenwasserstoff- und paraffinoxydierende Bakterien hatten Tauss u. Donath bereits 1930 die Fähigkeit zur H_2-Aktivierung bei *Bact. aliphaticum liquefaciens* festgestellt und kamen dabei zu einer sehr modern anmutenden Vorstellung:

„Der Stoffwechsel behält auch im Falle des Abbaues von organischer und anorganischer Substanz die Prinzipien des Urstoffwechsels, nämlich mit Hilfe der Knallgasenergie die Kohlensäure zu assimilieren. Der Wasserstoff wird dabei aus dem betreffenden Substrat abgespalten und die Kohlensäure bei anorganischem Stoffwechsel aus der Atmosphäre, bei organischem durch schließliche Decarboxylierung aus dem Substrat entnommen. Demnach ginge der gesamte Kohlenstoffwechsel der Bakterien durch die Kohlensäure, hätte also einen verdeckt assimilatorischen Charakter."

In ihrer fundamentalen Untersuchung über die Aktivierung des molekularen Wasserstoffs durch mehrere sulfatreduzierende und methanbildende anaerobe Bakterien, die aus Flußschlamm isoliert worden waren, schlugen Stephenson u. Stickland (1931a) vor, das H_2-aktivierende Enzym mit „Hydrogenase" zu bezeichnen. Sie nahmen bereits eine weitgehende Charakterisierung vor, bestimmten die Abhängigkeit vom p_{H_2}, stellten fest, daß die H_2-Aktivierung noch durch m/24 KCN kaum gehemmt wird, daß Urethan nur schwach hemmt und daß außer Methylenblau auch Fumarsäure und Nitrat reduziert werden. Die quantitative Analyse der Sulfatreduktion mit H_2 als H-Donator ließ die theoretisch zu erwartenden Werte ermitteln (1931b). Da sich auch *E. coli* als hydrogenasehaltig erwies, wurden weitere Untersuchungen an diesem leicht zu kultivierenden Organismus vorgenommen (Stickland, 1931).

An Suspensionen von *E. coli* wurde unter H_2-Atmosphäre mit Methylviologen als Redoxfarbstoff das Redoxpotential gemessen (Green u. Stickland, 1934) und gezeigt, daß sich dabei dasselbe Gleichgewicht zwischen

$$H_2 \rightleftharpoons 2H \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$$

einstellt wie bei Anwesenheit von Pt oder Pd. Bei einem p_{H_2} von 600 mm Hg, p_H 7,02 und 30° C betrug $E = -0{,}401$ Volt; theoretisch $E_h = -0{,}408$ Volt. Das Hydrogenasesystem ist demnach das negativste, das man bisher bei lebenden Zellen beobachten konnte, und setzt die Organismen, die durch seinen Besitz ausgezeichnet sind, in die Lage, alle Stoffe zu reduzieren, für die die entsprechenden Überträger vorhanden sind.

Die nächsten Jahre brachten eine Fülle von Arbeiten, in denen die Fähigkeiten zur H_2-Aktivierung und -Verwertung zu den verschiedensten Reduktionsprozessen bei einer großen Anzahl von Bakterienarten und -gattungen festgestellt wurde, von denen die wichtigsten und bekanntesten in der Tabelle wiedergegeben werden.

Das Ferment Hydrogenase und die Fähigkeit zur Übertragung des aktivierten Wasserstoffs auf eine Reihe von Acceptoren sind sicher nicht nur auf eine kleine Gruppe von Organismen beschränkt, die gewissermaßen konstitutiv zur Bildung dieses Fermentes befähigt sind. Vermutlich wird sich die Zahl der zur H_2-Aktivierung befähigten Organismen als beträchtlich höher erweisen, wenn unter Kulturbedingungen untersucht wird, die zur Induktion der Hydrogenasebildung geeignet sind

(H_2-haltige Atmosphäre, Herabsetzung der Konzentration organischer H-Donatoren und akzessorischer Nährstoffe auf ein Minimum).

Für die sulfatreduzierenden Bakterien, über deren Hydrogenaseaktivität man bereits seit Stephenson u. Stickland (1931) gut unterrichtet ist, war die Befähigung zur autotrophen Lebensweise mit H_2 als Energiequelle bereits an Rohkulturen aufgezeigt worden (Wight u. Starkey, 1945) und wurde später mehrfach bestätigt (Butlin u. Adams, 1947; Butlin, Adams u. Thomas, 1949; Sisler u. Zobell, 1951; Senez u. Volcani, 1951; Ssorokin, 1953). Unter Sulfatreduktion, die unter Ausschluß von CO_2 etwa nach

$$H_2SO_4 + 4H_2 \rightarrow H_2S + 4H_2O \qquad [14]$$

verläuft, bindet *Sporovibrio desulfuricans* im CO_2-haltigen Medium CO_2, wobei das H_2/H_2S-Verhältnis 5—10 betragen kann, was allein schon darauf hindeutet, daß CO_2 als H-Acceptor auftreten kann (Sisler u. Zobell, 1951). Bei ruhenden Zellen konnten Sulfit, Metabisulfit, Dithionit, Thiosulfat und Tetrathionat an die Stelle von Sulfat treten (Postgate, 1951).

Nachdem die Existenz von Organismen, die anaerob unter H_2-Nutzung mit KNO_3 als H-Acceptor autotroph wachsen können, bereits postuliert worden war (Foster), konnte Kluyver kürzlich über einen derartigen Fall berichten (1953). *Micrococcus denitrificans* vermochte nach Kultur auf dem üblichen Peptonmedium zur Nitratreduktion keinen molekularen H_2 zu verwenden. Nachdem aber einmal an einem neu isolierten Stamm die notwendigen Bedingungen ermittelt worden waren, unter denen der Organismus eine Hydrogenase aktiviert und unter Nitratreduktion CO_2 zu assimilieren vermag (Mineralsalzlösung mit 2% KNO_3 und 0,3% Hefeautolysat unter H_2), erwies sich auch der alte Stamm der H_2-Nutzung fähig. Er vermochte dann sogar außer KNO_3 auch O_2 zu reduzieren.

Daß derartige Induktionsversuche nicht in allen Fällen zum Erfolg führen werden und auch die substratinduzierte Hydrogenasebildung gewisse genetische Anlagen zur Voraussetzung hat, erhellt aus der Tatsache, daß ein halophiler Stamm („*El Agheila Z*") von *Desulfovibrio desulfuricans* aufgefunden wurde, der sich bisher nach keinem der üblichen Anpassungsverfahren zur H_2-Aktivierung bewegen ließ (Adams u. Mitarb., 1951).

Wie die zuletzt geschilderten Untersuchungen zeigen, ist die Ausbildung des Hydrogenasefermentes in hohem Maße von den Kulturbedingungen abhängig. Die H_2-Aktivierung gehört selbst bei den Organismen, bei denen das Enzym als konstitutiv anzusehen ist, zu den labilen Eigenschaften. Namentlich die Art der N-Quelle scheint von maßgeblicher Bedeutung zu sein insofern, als Nitrat die Bildung sowohl von Hydrogenase als auch von Ameisensäure-Dehydrogenase und Hydrogenlyase

Tabelle 1. *Zusammenstellung der bekanntesten zu H_2-Aktivierung befähigten heterotrophen Bakterien.*

Organismus	Substrat	Endprodukt	Autor
Bact. spec.	Kohlendioxyd, Kohlenmonoxyd, Ameisensäure, Formaldehyd, Methanol	Methan	Stephenson u. Stickland (1933)
E. coli	Kohlendioxyd	Ameisensäure	Woods (1936)
Proteus vulgaris	Isotopenaustausch		Hobermann u. Rittenberg (1943)
Clostridium	Kohlendioxyd	Essigsäure	Wieringa (1936)
Cl. welchii	Nitrat	Ammoniak	Woods (1938)
Cl. sporogenes	Aminosäuren	Produkte der reduktiven Desaminierung	Hoogerheide u. Kocholaty (1938)
Cl. kluyveri	Acetat u. Acetylphosphat	Buttersäure	Stadtman u. Barker (1949)
Bact. delbrückii	Nitrat, Sauerstoff		Nakamura u. Yamagata (1937)
Sporovibrio desulfuricans	Sulfat, Thiosulfat, Schwefel	Schwefelwasserstoff	Stephenson u. Stickland (1931)
Sporovibrio desulfuricans	Sulfat, Sulfit, element. Schwefel	Schwefelwasserstoff	Postgate (1951)
Acetobacter peroxydans	Sauerstoff, Wasserstoffperoxyd	Wasser	Wieland u. Pistor (1936)
Micrococcus phosphoreus	Nitrat, Sauerstoff Fumarsäure		Nakamura (1938)
Micrococcus denitrificans	Nitrat, Sauerstoff und andere		Kluyver (1953)
Methanobacterium barkeri	Kohlenmonoxyd	Methan	Kluyver u. Schnellen (1947)
Methanobacterium omelianskii	Kohlendioxyd	Methan	Stadtman u. Barker (1951)
Methanobacterium formicicum	Kohlendioxyd	Methan	
Methanococcus vannielii	Kohlendioxyd	Methan	
Azotobacter			Phelps u. Wilson (1941)

hemmt, besonders wenn es zu Beginn des Wachstums gegeben wird (Billen, 1951, an *E. coli*). Bei *Azotobacter vinelandii* beträgt der Q_{H_2} (N) MBl von Zellen, die unter N_2-Fixierung gewachsen sind, 23000, auf Ammon-

acetat 6100 und auf Nitrat gezogener Zellen 7200. Dieses Verhältnis wird in diesem speziellen Falle als enge Verknüpfung von Hydrogenase und Nitrogenase angesehen (Green u. Wilson, 1953). Selbst Knallgasbakterien weisen nach Kultur auf einem Medium mit Ammoniak als N-Quelle unter sonst gleichen Bedingungen eine höhere Hydrogenaseaktivität auf als auf KNO_3-haltigem Medium gewachsene (Schlegel, unveröffentlicht). Daß ausgesprochener N-Mangel zu einer Herabsetzung der Aktivität der an der Aufnahme und Entbindung des H_2 beteiligten Enzyme führt (De Ley, 1951, an *E. coli*), überrascht nach den entsprechenden Befunden an anderen Dehydrogenasesystemen nicht.

c) Photoautotrophe Bakterien.

Mit der Entdeckung, daß auch *Purpurbakterien* in der Lage sind, gasförmigen Wasserstoff im Photosynthese-Stoffwechsel zu verwerten (Roelofsen, 1934, Gaffron, 1935), begann der molekulare Wasserstoff in der vergleichenden Biochemie der Photosynthese eine Rolle zu spielen.

Roelofsen (1934) untersuchte an einigen *Thiorhodaceen* den Einfluß verschiedener Faktoren auf den Dunkel- und Lichtstoffwechsel und fand, sofern CO_2 anwesend war, eine H_2-Aufnahme im Dunkeln, die im Licht erheblich rascher verlief. Unter einem ganz geringen Na_2S-Zusatz (0,005% Na_2S) wurde unter H_2/8%CO_2-Atmosphäre im Licht auch gutes Wachstum erzielt. An *Athiorhodaceen (Rhodovibrio)* konnte dann Gaffron (1935) quantitative Ergebnisse erzielen und einen H_2/CO_2-Quotienten von 2 ermitteln.

$$2H_2 + CO_2 = CH_2O + H_2O. \qquad [15]$$

Eine Aufnahme von H_2 wurde auch bei der Nitratreduktion und Acetatvergärung beobachtet.

Hinsichtlich der Lichtreaktion, nicht der Reduktion im Dunkeln, konnte Nakamura (1937) an *Rhodobacillus palustris* diese Ergebnisse bestätigen. Spätere Untersucher kamen mit etwas abgeänderten Methoden zu H_2/CO_2 = 2,3 bis 2,9 (Wessler u. French, 1939, bei *Streptococcus varians*) und 2 (Wassink, 1942, bei *Chromatium* Stamm D). Nakamura wies nicht nur die H_2-Aufnahme an sich nach, sondern machte auf Grund von Versuchen mit Methylenblau, Nitrat, Nitrit u. a. H-Acceptoren für diese H_2-Aktivierung das Ferment Hydrogenase verantwortlich. Im Gegensatz zu Roelofsen und Gaffron nahm er aber an, daß der aufgenommene Wasserstoff nicht direkt zur CO_2-Reduktion benutzt wird, sondern wie auch H_2S und andere H-Donatoren mit den bei der H_2S-Spaltung zurückgebliebenen OH-Radikalen reagiert, daß der zur CO_2-Reduktion benutzte Wasserstoff also aus dem Wasser stammt. Außer den schon genannten H-Acceptoren vermag *Rhodobacillus palustris* noch Fumarsäure, Thiosulfat, Schwefel und O_2 zu reduzieren (Nakamura,

1937b), die Thiorhodacee *Chromaticum minutissimum* aber Sulfat, Sulfit und Thiosulfat.

Auf Grund ihrer weitgespannten Untersuchungen sahen Nakamura u. Yamagata (1937) die Hydrogenase als eine für molekularen Wasserstoff spezifische Dehydrogenase an und machten die Acceptorspezifität von der Anwesenheit eines spezifischen Enzyms „Nitratreduktase", „Sulfatreduktase" usw. abhängig, eine Auffassung, die bis heute unwidersprochen geblieben ist.

$$\text{H-Acceptor} \leftarrow \underset{\text{„Reduktase"}}{\text{Zwischenacceptor}} \leftarrow \underset{\text{Hydrogenase.}}{H_2}$$

Auf einem Malat-Thiosulfat-Medium gewachsene Thiorhodaceen (*Chromatium* St. D) können zur CO_2-Reduktion sowohl Thiosulfat als auch H_2 als H-Donator benutzen; doch entfallen bei kombinierter Verabreichung auf H_2 nur 32 Mol% (Wassink, Katz u. Dorrestein, 1942).

An Purpurbakterien wurde auch zum ersten Male die H_2-Verwertung mit dem Phosphatstoffwechsel in Beziehung gesetzt (Wassink, Tjia u. Wintermans, 1949). *Chromatium* St.D nimmt im Licht anorganisches Phosphat in die Zellen auf. Wenn auch keine Bestimmung des organischen, leicht abspaltbaren Phosphats erfolgte, so ist doch anzunehmen, daß das aufgenommene, anorganische Phosphat in organisches übergeführt wurde. Da die Phosphataufnahme unter einer Atmosphäre von $N_2/30\%H_2$ ungleich größer war als unter $N_2/1\%CO_2$, erscheint es wahrscheinlich, daß die Bildung von energiereichem Phosphat unter H_2-Aufnahme vor sich geht.

Kürzlich wurde die Photoreduktion der Kohlensäure mittels H_2 durch *Rhodospirillum rubrum* unter Verwendung von $^{14}CO_2$ weiter verfolgt (Glover, Kamen u. van Genderen, 1952). Der während der ersten 12 sec eingebaute ^{14}C verblieb fast quantitativ in den Phosphatestern der wasserlöslichen Fraktion, wobei fast 40% auf die Phosphoglycerinsäure entfielen. Wenn ein Dunkeleinbau auch erfolgte, so war er doch beträchtlich geringer als der $^{14}CO_2$-Einbau im Licht.

d) Algen.

Nachdem die Fähigkeit zur H_2-Aktivierung und Photoreduktion des Kohlendioxyds mittels molekularen Wasserstoffs einmal an den phototrophen Purpurbakterien entdeckt worden war, lag die Vermutung nahe, daß auch photoautotrophe grüne Organismen von dieser Möglichkeit — wenigstens unter bestimmten Bedingungen — Gebrauch machen könnten. So hat auch Roelofsen (1934) bereits versucht, die Alge *Stichococcus bacillaris* zur H_2-Aufnahme zu bewegen, doch ohne Erfolg. Gaffron (1940) gelang es, je einen Stamm von *Scenedesmus* und *Rhaphidium* in Kultur zu nehmen, die sich an anaerobe Bedingungen anpassen ließen und den molekularen Wasserstoff als H-Donator benutzen können. Wird

Scenedesmus anaerob gehalten, so wird nach einem längeren Verweilen in N_2 oder H_2 in den Zellen ein gewisser „reduzierter Zustand" erreicht (und dabei wahrscheinlich Hydrogenase oder ein hydrogenaseartiges Ferment aktiviert), in dem bei Belichtung eine Entwicklung von Assimilations-O_2 unterbleibt. Unter einer H_2-CO_2-Atmosphäre ist bei Belichtung eine H_2-Aufnahme ohne gleichzeitige O_2-Entbindung zu beobachten. Wie bei den Purpurbakterien beträgt $H_2/CO_2 = 2$. Mit der Erhöhung der Lichtstärke steigt die Intensität der Gasaufnahme zunächst an, um dann bei einer Lichtstärke von 500 Lux zu einer O_2-Entbindung zu führen. Es reichern sich dann die peroxydischen Zwischenprodukte der Photosynthese so stark an, daß die zur Verfügung stehenden H-Donatoren nicht mehr ausreichen und eine assimilatorische O_2-Abscheidung erfolgt. Eine anschließende Herabsetzung der Lichtstärke hat noch keine erneute H_2-Aufnahme zur Folge. Diese kann erst durch eine längere anaerobe Vorbehandlung erreicht werden. Wird anaerob adaptierter *Scenedesmus* in einer $H_2/1\%O_2$-Atmosphäre gehalten, so wird H_2 auch im Dunkeln mit O_2 verbrannt, also eine Knallgasreaktion durchgeführt, die mit einer Chemosynthese gekoppelt werden kann (Gaffron, 1942a)

$$6H_2 + 2O_2 + CO_2 \rightarrow (CH_2O) + 5H_2O.$$

Einiger Bemerkungen bedürfen auch die Ergebnisse von Hemmungsversuchen mit spezifischen Giften. Bei der Knallgasreaktion wird durch Cyanid zuerst die CO_2-Reduktion unterbunden und dann das Hydrogenasesystem gehemmt. NH_2OH schaltet, wenn es überhaupt wirkt, nur die CO_2-Reduktion aus, wirkt aber nicht auf das Hydrogenasesystem. Auch Dinitrophenol hemmt nur die CO_2-Assimilation, ohne die H_2-Oxydation zu beeinträchtigen. Die Reduktion der Kohlensäure im Licht (Photoreduktion) mittels H_2 wird durch Cyanid stärker gehemmt als die normale Photosynthese, woraus folgt, daß die O_2-Freisetzung nicht der empfindlichste Prozeß der Photosynthese sein kann (Gaffron, 1942b). Dinitrophenol hemmt außerordentlich; Kohlenmonoxyd hemmt alle Phasen der Photoreduktion und wird als spezifischer Hemmstoff der Hydrogenase angesehen. Es fördert dadurch die Rückführung in den unempfindlichen Prozeß der normalen Photosynthese. Hydroxylamin beeinträchtigt den stationären Zustand der Photoreduktion weniger als die normale Photosynthese; obwohl es die Adaptationsreaktion, also die Umschaltung auf den Photoreduktionsprozeß, auch hemmt, schützt es (10^{-3}m) den anaeroben Stoffwechsel vor der Rückkehr zur gewöhnlichen aeroben Photosynthese auch bei höheren Lichtstärken. Außer NH_2OH haben noch andere Substanzen von ganz verschiedenem chemischen Charakter wie o-Phenanthrolin, Vitamin K oder Phthiokol die Eigenschaft, mit steigender Konzentration die Photoreduktion bis auf den halben Maximalwert herabzusetzen und den Restumsatz unbeeinflußt zu lassen. Ferner wird die Photoreduktion gegen die mit steigender

Lichtintensität normalerweise erfolgende Rückkehr zur normalen Photosynthese stabilisiert (Gaffron, 1945).

Seither wurden eine ganze Reihe von Algen für fähig befunden, H_2 in einer Photoreduktion zu nutzen, darunter *Synechococcus elongatus* als Vertreter der *Cyanophyceae* (Frenkel, Gaffron u. Battley, 1949/50), *Porphyridium cruentum*, *Porphyra umbilicalis (Rhodophyceae)*, *Ascophyllum nodosum (Phaeophyceae)* und *Ulva lactuca* unter den *Chlorophyceae* (Frenkel u. Rieger, 1951). Sogar die Chloroplasten höherer Pflanzen sollen Hydrogenase enthalten und zur CO_2-Reduktion mit Hilfe des molekularen Wasserstoffs fähig sein (Boitschenko, 1950/51). Der durch isolierte Chloroplasten aus *Trifolium* und *Primula* unter einer Atmosphäre von $H_2/2\%O_2/^{14}CO_2$ fixierte Kohlenstoff wurde in Uronsäuren und carboxylgruppenreichen organischen Säuren wiedergefunden (Vinogradov, Boitschenko u. Baranov, 1951).

Der Mechanismus der Photoreduktion ist noch ebenso unklar wie der der Photosynthese. Die wichtigsten Denkmöglichkeiten hat bereits Gaffron (1940) diskutiert. Wenn der molekulare Wasserstoff direkt an die Stelle des Wassers träte, so würde das eine zu tiefgreifende Umstellung des Photosynthesestoffwechsels sein. Gleichfalls abzulehnen ist die Annahme, daß der Photosynthesemechanismus normal erhalten bleibt und der gebildete O_2 mit H_2 in einer Knallgasreaktion umgesetzt wird. Mit Nakamura (1937) nimmt Gaffron an, daß CO_2 mit dem aus Wasser abgespaltenen Wasserstoff reduziert wird und die als Rest zurückbleibenden Photoperoxyde sowohl in den Bakterien als auch in den Algen vermittels des Hydrogenase aktivierten Wasserstoffs reduziert werden, oder verallgemeinernd ausgedrückt, vermittels aller H-Donatoren, für die spezifische Enzyme vorhanden sind. Eine Darstellung im Zusammenhang mit den Problemen der Photosynthese findet sich bei Pirson (1950/53). Der erörterten Frage wäre wohl schon längst mit der Isotopentechnik nachgegangen worden, wenn es sich nicht gerade um Wasserstoff handelte, der auch schon ohne jede enzymatische Katalyse mit seinen Isotopen rasch ausgetauscht wird (Farkas u. Yudkin, 1934, Hobermann u. Rittenberg, 1943).

III. Beziehungen zwischen H_2-Stoffwechsel und N_2-Fixierung.

Eine überaus fruchtbare Anregung hat die Erforschung der mit dem H_2-Stoffwechsel im Zusammenhang stehenden Fragen durch die Entdeckung erfahren, daß sich molekularer Wasserstoff bei der N_2-Fixierung des Rotklees nicht biologisch inert verhält, sondern als spezifischer Hemmstoff des Fixationsprozesses anzusehen ist (Wilson u. Umbreit, 1937).

Diese Fragestellung vermochten die Untersuchungen an 3 *Azotobacter*-arten *(A. chroococcum, A. agile, A. vinelandii)* zu bestätigen (Wyss u.

Wilson, 1941). Während die N_2-Fixierung von den zur Verdünnung der N_2-Atmosphäre (0,3 at. N_2 + 0,2 at. O_2) verwendeten Edelgasen He oder Ar in keiner Weise beeinträchtigt wird, setzt H_2 die N_2-Bindung beträchtlich herab. Daß die Hemmung des Wasserstoffs nicht auf einer unspezifischen Hemmung irgendwelcher Wachstumsprozesse beruht, beweist der Befund, daß die Assimilation gebundenen Stickstoffs (NH_4NO_3) von H_2 in keiner Weise beeinträchtigt wird.

Der Nachweis einer aktiven Hydrogenase in *Azotobacter* (Phelps u. Wilson, 1941, Wilson, Lee u. Wilson, 1942) löste eine Reihe von Vermutungen über die Beziehungen zwischen N_2-Fixierung und H_2-Aktivierung aus, die sich später zwar nicht in ihrem vollen Umfange bestätigen ließen, aber für die Erforschung der vergleichenden Biochemie der N_2-Bindung einen großen Arbeitsimpuls darstellten. Man nahm an, daß zwischen Nitrogenase, dem Enzym, das den ersten Schritt der N_2-Bindung bewirken soll, und Hydrogenase in dem Sinne ein engerer Zusammenhang besteht, daß alle zur N_2-Fixation befähigten Organismen auch den molekularen H_2 aktivieren könnten. Bei *Azotobacter* haben die weiteren Untersuchungen wirklich eine weitgehende Übereinstimmung im Verhalten der beiden Enzyme gegenüber verschiedenen Ernährungseinflüssen aufgedeckt. So setzt beispielsweise Nitrat-N sowohl die Hydrogenaseaktivität als auch die N_2-Fixation herab, sogar wenn unter Knallgasatmosphäre kultiviert wird (Lee u. Wilson, 1943). Auch in späteren Arbeiten (Green, Alexander u. Wilson, 1953) kommt übereinstimmend zum Ausdruck, daß die unter N_2-Fixierung gewachsenen Bakterien gegenüber den mit gebundenem Stickstoff versorgten eine erheblich höhere Hydrogenaseaktivität haben. Doch traten eine Reihe von Mutanten auf, die zwar keinen N_2 mehr nutzen konnten, aber noch über eine funktionsfähige Hydrogenase verfügten. Eine obligatorische Verknüpfung beider Fähigkeiten scheint also selbst bei diesem Organismus nicht vorzuliegen.

Im Falle der symbiontischen N_2-Fixierung der Leguminosen hatte eine gründliche Untersuchung erwiesen, daß weder frisch aus den Knöllchen entnommene Bakterien noch in Reinkultur auf Agarmedium gezogene *Rhizobien* Hydrogenase enthalten (Wilson, Burris u. Coffee, 1943). Da die Knöllchenbakterien eine hohe Eigenatmung besitzen und nur schwer von den mitgeschleppten Substratresten und Membranschleimen zu trennen sind, wurde Hydroxylamin, das (m/1000) die Atmung viel stärker hemmt als die Hydrogenasefunktion, zugesetzt. Aber selbst unter diesen Bedingungen verliefen alle Versuche, eine H_2-Aktivierung nachzuweisen, negativ (Wilson u. Wilson, 1943).

Auch bei *Clostridium pasteurianum*, das als anaerober N_2-Fixierer besonderes Interesse erregte, erwies sich der Vorgang der N_2-Bindung nicht nennenswert empfindlich gegen H_2. Es wird nur das Ausmaß, nicht die

Geschwindigkeit der Bindung herabgesetzt (Rosenblum u. Wilson, 1950). Dieser Befund braucht noch nicht zu dem Schluß zu führen, daß sich der Fixierungsprozeß von dem bei *Azotobacter* grundlegend unterscheidet, sondern kann bei einem prinzipiell gleichen Mechanismus seine Ursache darin haben, daß *Clostridium* beim Kohlenhydratabbau normalerweise H_2 entbindet und daher auf sein Vorhandensein im Medium in gewisser Weise eingestellt ist.

Angeregt durch die zuerst von P. W. Wilson ausgesprochene Vermutung, daß zwischen N_2-Bindung und H_2-Aktivierung auch insofern eine Beziehung besteht, als alle hydrogenaseaktiven Organismen auch zur N_2-Bindung befähigt sein sollten, wurde unter den hydrogenasehaltigen Organismen eine Nachsuche angestellt, die im Laufe weniger Jahre (1949—1953) zur Entdeckung einer größeren Anzahl von stickstoffbindenden Arten führte, als seit Hellriegel u. Willfahrt (1886) bis 1949 bekannt geworden waren. In dieser Feststellung kommt der große Erfolg der vergleichenden Biochemie am besten zum Ausdruck. Begünstigt wurden diese Forschungen durch die Entwicklung der Isotopentechnik. In vielen Fällen waren die Effekte jedoch so groß, daß sie nachträglich auch nach der üblichen Kjeldahl-Methode erfaßt werden konnten.

Die Entdeckung der N_2-Fixierung bei den Purpurbakterien nahm ihren Ausgang von der Beobachtung (Kamen u. Gest, 1949), daß die H_2-Entwicklung im Licht bei *Rhodospirillum rubrum* nur unter Edelgas oder H_2-Atmosphäre vor sich geht, nicht aber unter N_2. An wachsenden Kulturen konnte die N_2-Bindung mittels $^{15}N_2$ auch mühelos nachgewiesen und später sogar nach der Kjeldahl-Methode bestätigt werden (Lindstrom, Burris u. Wilson, 1949). Bald darauf wurden entsprechende Befunde von Schwefelpurpurbakterien (*Chromatium*, an dem durch Newton u. Wilson [1952] auch die N_2-Hemmung der H_2-Entwicklung bestätigt wurde) und grünen Bakterien mitgeteilt (Lindstrom, Tove u. Wilson, 1950) und die Zahl der geprüften und zur N_2-Bindung für fähig befundenen Arten (*Rhodopseudomonas*: 4 Arten; *Rhodomicrobium vannielii*) vermehrt (Lindstrom, Lewis u. Pinsky, 1951). Schließlich konnten Sisler u. Zobell (1950, 1951) zeigen, daß auch der sulfatreduzierende, hydrogenaseaktive Anaerobier *Desulfovibrio desulfuricans* zur N_2-Bindung befähigt ist.

Wiederholte Versuche, eine N_2-Bindung bei anderen H_2-aktivierenden Organismen, wie *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Scenedesmus* und *Hydrogenomonas* nachzuweisen, schlugen jedoch fehl. Der Besitz von Hydrogenase allein berechtigt also noch nicht zu der Voraussage, daß eine Stickstoffixierung stattfinden kann (Wilson, 1952). Es wird jedoch darauf hingewiesen, daß „other strains of *Hydrogenomonas* should be tested since

this organism is the ideal candidate for the aerobic, autotrophic slot" (Wilson, 1952).

Wenn abschließend festzustellen ist, daß weder alle Stickstoff-Fixierer Hydrogenase enthalten noch vice versa alle der H_2-Aktivierung fähigen Organismen den molekularen Stickstoff zu nutzen vermögen, so hat sich doch die Wilsonsche Konzeption in zahlreichen Fällen bewährt und zur Aufdeckung vorher kaum für möglich gehaltener Zusammenhänge geführt.

IV. Charakterisierung des H_2-aktivierenden Fermentes.

Die Vorstellung, daß Hydrogenase oder das Hydrogenasesystem molekularen Wasserstoff aktiviert und auf Zwischenacceptoren überträgt, von denen er dem Oxydationssystem zugeleitet wird (Nakamura u. Yamagata, 1937), wurde von Umbreit (1950) präzisiert

$$H_2 \overset{a}{\rightleftharpoons} 2H \overset{b}{\rightleftharpoons} \underset{d \Downarrow}{2H^+} + 2e^- \overset{c}{\rightarrow} \text{zu Überträgern} \qquad [16]$$

zu Überträgern
(Zwischenacceptoren).

Von den 4 im Schema gegebenen Reaktionen betrifft nur *a* die Hydrogenasewirkung im engeren Sinne und es ist noch nicht bekannt, ob *b*, *c* und *d* durch dasselbe Enzym katalysiert werden. Der Lösung dieser Frage ist auf 2 Wegen näher zu kommen: Durch Anwendung von Testmethoden höherer Spezifität für den Vorgang der H_2-Aktivierung unter Ausschaltung möglicher Zwischenreaktionen und durch Herstellung zellfreier Extrakte mit dem Ziel der Isolierung des Fermentes.

Das erste hydrogenasewirksame zellfreie Präparat wurde aus *E. coli* gewonnen (Bovarnick, 1941). Nach der Glaspulverreibemethode hergestellte Extrakte enthielten neben einigen Dehydrogenasen auch Hydrogenase. Durch Gefrieren und Trocknen im Vakuum und Wiederauflösen in destilliertem Wasser wurde das Enzym nicht geschädigt (Kalnitzki u. Werkman, 1943). Weitere Untersuchungen an *E. coli*-Hydrogenase liegen von Back u. Mitarb. (1946) und Joklik (1950) vor. Die Extrakte wurden durch Reiben mit Glaspulver im Mörser und Herauslösen mit dest. Wasser, Phosphatpufferlösungen oder Kaliumchloridlösung hergestellt. Sie erwiesen sich bei Aufbewahrung am Eispunkt als recht stabil. Die Aktivität der abzentrifugierten zellfreien Lösung wurde an der manometrisch gemessenen H_2-Aufnahme mit Methylenblau als H-Acceptor bestimmt. Die 2gipflige Aktivitäts-p_H-Kurve hatte Optima bei p_H 6,7 und 7,7. Eine fraktionierte Ammonsulfatfällung führte zwar zu einer Erhöhung der Aktivität (bezogen auf Gesamt-N) und Einengung in der H-Acceptorspezifität, aber nicht zu einem einheitlichen Enzympräparat. Hemmungsversuche zeigten, daß Schwermetallsalze ($CuSO_4$, $HgSO_4$, $AgNO_3$ u. a.) stark giftig wirken; aber auch Cyanid, Azid und

Kohlenmonoxyd beeinträchtigten die Wirksamkeit des Präparates. Im ganzen waren die Ergebnisse aber noch so komplex, daß nur wenig über die Natur des Fermentes ausgesagt werden konnte. An hydrogenasewirksamen Extrakten aus *Azotobacter* (Lee, Wilson u. Wilson, 1942) ließ sich zum ersten Male eine zellfreie Knallgasreaktion demonstrieren. Ferner wies die Tatsache, daß Cyanid die Methylenblaureduktion mittels H_2 stimuliert, die H_2-Oxydation aber hemmt, darauf hin, daß die Hydrogenase in *Azotobacter* kein schwermetallhaltiges, cyanidhemmbares Ferment sein kann.

Bei der Fortsetzung der Untersuchungen an *Azotobacter vinelandii* (Hyndman, Burris u. Wilson, 1953) wurde nach der Alumina-Methode vorgegangen. Zur Verwendung kam allerdings nicht ein teilchenfreier Extrakt, sondern eine durch Zentrifugieren mit 29000 g erhaltene Fraktion von subcellularen Partikeln. Diese zellfreien Teilchen vermochten außer Methylenblau und Sauerstoff auch eine Reihe von Redoxfarbstoffen, Ferricyanid und Cytochrom c zu reduzieren, während eine Reduktion von Diphosphopyridin-Nucleotid (DPN) nicht festgestellt werden konnte. Die Durchprüfung einer Reihe von komplexen und reinen Substanzen auf ihre mögliche Co-Ferment-Wirksamkeit bei der H_2-Aufnahme mit Ferricyanid als H-Acceptor blieb ohne Erfolg.

In einer Paralleluntersuchung an *Azotobacter vinelandii* und *Az. agile* (Green u. Wilson) zeigten sich Unterschiede zwischen den aus beiden Organismen hergestellten Enzympräparaten schon in der Stabilität während der Lagerung, die bei *Az. agile* sehr gering war. p-Chloromercuribenzoesäure (10^{-5}m) führte zu einer Hemmung, die bei Verabreichung des Giftes unter Luft stärker war als unter H_2. Die Hydrogenaseaktivität ist vorwiegend an die Partikelfraktion (29000 g) gebunden.

Eine noch weitergehende Anreicherung ist Gest (1952) an zellfreien Extrakten aus *E. coli* und *Rhodospirillum rubrum* gelungen. Wenn acetongetrocknete Zellen auch über eine hinreichende Aktivität verfügen, so ist doch frischen Zellen der Vorzug zu geben. Eine Anreicherung des Enzyms aus den Extrakten, deren wirksamste auch hier nach der Alumina-Methode erhalten wurden, war durch fraktionierte Ammonsulfatfällung in der Kälte und Adsorption an MnO_2 möglich. Die Aufbewahrung erfolgte am schonendsten bei 5° C unter H_2; im gefrorenen Zustand oder an der Luft erleidet das Präparat erhebliche Aktivitätsverluste. Die Vermutung (Joklik), daß *Rhodospirillum*-Hydrogenase essentielle Sulfhydrylgruppen enthalte, ließ sich nicht bestätigen. Es war weder eine Reaktivierung des durch Luft-Sauerstoff geschädigten Enzyms mittels Cystein möglich, noch übte der spezifische SH-Gruppen-Inhibitor p-Chloromercuribenzoesäure (10^{-3} m) eine nennenswerte Hemmung aus. Da andererseits auch Schwermetallkomplexbildner wie 1,10-Phenanthrolin, $\alpha\alpha'$-Dipyridyl und Diäthyldithiocarbamat in

Konzentrationen bis 0,01 mol/*l* selbst nach längerem Kontakt die Hydrogenasepräparate nicht hemmen, scheinen auch keine Schwermetalle an der Aktivität beteiligt zu sein. Als H-Acceptoren eignen sich weder DPN noch Kaliumferricyanid, Sulfat oder Nitrit, sondern nur Methylenblau.

Nachdem bereits festgestellt worden war (Stadtman u. Barker, 1949), daß zellfreie Extrakte aus *Cl. kluyveri* in der Lage sind, eine Reihe von Reduktionen mittels molekularem H_2 zu bewirken, so u. a. die von Vinylessigsäure oder Essigsäure + Acetylphosphat zu Buttersäure,

$$CH_2 = CH - CH_2 - COO' + H_2 \rightarrow CH_3 - CH_2 - CH_2 - COO'$$

$$CH_3 - C(=O) - O - PO_3'' + CH_3 - COO' + 2H_2 \rightarrow CH_3 - (CH_2)_2 - COO' + HPO_4'' + H_2O$$

ist an dialysierten Extrakten aus *Cl. kluyveri* nun auch die Fähigkeit zur DPN-Reduktion beobachtet worden (Korkes u. Stadtman). In einem System von DPN, Milchsäure-Dehydrogenase und *Cl. kluyveri*-Extrakt wird H_2 aktiviert und auf Brenztraubensäure übertragen.

$$\text{Brenztraubensäure} + H_2 \xrightarrow[+\text{ DPN} + \text{Extrakt}]{\text{Milchsäure-Dehydr.}} \text{Milchsäure.}$$

Bei Koppelung des hydrogenasehaltigen Extraktes mit Triphosphopyridin-Nucleotid und einem Hefeenzym, das Glutathion (GSSG) reduziert (GSH), geht eine Glutathionreduktion unter H_2-Aufnahme vor sich.

$$H_2 + GSSG \rightarrow 2\,GSH.$$

Bei langdauernder Dialyse geht dem Extrakt ein hitzestabiler, anscheinend metallhaltiger Faktor verloren.

Mit den üblichen Nachweisreaktionen der Aktivierung des molekularen Wasserstoffs, der Reduktion von O_2, Methylenblau oder anderen H-Acceptoren, werden außer dem eigentlichen Aktivierungsvorgang [16a] noch eine Reihe von Übertragungsvorgängen erfaßt. Da infolgedessen dem Ferment Hydrogenase leicht Eigenschaften zugeschrieben werden können, die in Wirklichkeit den Überträgern zukommen, zielten einige Untersuchungen darauf ab, eine Methode zu finden, mit der die reine H_2-Aktivierung gefaßt werden kann. Als solche wurde die Austauschreaktion

$$D_2 + H_2O = HD + HDO$$

mit schwerem Wasserstoff und neuerdings mit Tritium mehrfach angewandt (Smith u. Mitarb., 1952, 1953).

Auf die auch dieser Methode eigenen Schwierigkeiten haben bereits Farkas u. Yudkin hingewiesen. Auch ohne enzymatische Katalyse findet zwischen Wasser und molekularem Wasserstoff ein Austausch statt, der die Fermentwirkung teilweise überdeckt. Hobermann u. Rittenberg untersuchten nach dieser Methode die Beeinflußbarkeit der Hydrogenase von *Proteus vulgaris* (ruhende Zellen) durch Gifte und

Luftsauerstoff. Aus der Tatsache, daß durch Schütteln mit Luft eine teilweise, reversible Inaktivierung eintrat, die durch Zusatz reduzierender Agentien oder unter H_2 rückgängig zu machen war, kann man schließen, daß das Ferment in einem oxydierten und einem reduzierten Zustand vorkommt, wobei reduzierende Bedingungen (Anaerobiose, H_2) mit der Dauer ihrer Einwirkung die Aktivität steigern (Farkas u. Fischer). Da KCN im oxydierten Zustand bedeutend stärker hemmt als im reduzierten Zustand und die Kohlenmonoxydhemmung im Licht rückgängig zu machen ist, sehen die Verf. im H_2-aktivierenden Ferment eine Eisen-Porphyrin-Verbindung. Es darf aber nicht übersehen werden, daß der Isotopenaustausch nur über ein Ionengleichgewicht hinweg erfolgen kann, folglich mit der Austauschreaktion nach

$$\begin{array}{l} 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2H \rightleftharpoons H_2 \\ \Updownarrow \\ 2H^+ + 2OH^- \rightleftharpoons 2H_2O \\ \Updownarrow \\ 2D^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2D \rightleftharpoons D_2 \end{array}$$

die Vorgänge *a* und *b* erfaßt werden (Umbreit). Eine Methode, nach der mit Sicherheit nur die Aktivierung des molekularen H_2 (*a*) gemessen werden kann, existiert nicht. Namentlich nach den Befunden an zellfreien Extrakten aus *Rhodospirillum rubrum* (Gest, 1952) hat es fast den Anschein, daß die Verwendung von Methylenblau als H-Acceptor und Indicator der H_2-Aktivierung nicht weniger spezifisch ist als der Deuterium-Austausch.

Es muß vorläufig noch dahingestellt bleiben, ob das Hydrogenaseferment bei all den Organismen, die molekularen Wasserstoff aktivieren können, sei es nun zur autotrophen CO_2-Assimilation oder sei es auch nur zur gelegentlichen Reduktion anderer H-Acceptoren, ein und dasselbe Ferment ist. Die Unterschiede in der Aktivität, der Stabilität gegen Sauerstoff und verschiedene Einwirkungen während der Präparation der Enzyme, der Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren und Reaktionsbedingungen u. a. m. möchten eher darauf hindeuten, daß es sich um mehrere Hydrogenasen handelt. Vielleicht ist in einigen Fällen die H_2-Aktivierung auch auf die Betätigung von Dehydrogenasen mit einem relativ großen Substratbereich zurückzuführen, die also neben einer Abspaltung von Wasserstoff aus Substraten auch die Aktivierung molekularen Wasserstoffs bewirken können. Mit dieser Annahme könnten die an verschiedenen Organismen gewonnenen, oft einander widersprechenden Befunde eine einleuchtende Erklärung finden.

Bei der Diskussion der Beziehungen zwischen der Hydrogenase und Hydrogenlyase-Reaktion wird häufig die Anschauung vertreten, daß die eine Reaktion der reversible Prozeß der anderen, demnach das wasserstoffseitige Terminalenzym in beiden Fällen das gleiche sei (Gaffron u.

Rubin, Gest, 1952, Woods, 1936). Diese Auffassung hat auch bereits in zusammenfassende Darstellungen Eingang gefunden (Brown u. Frenkel, Pirson, 1953). Selbst wenn diese Identität de facto bestünde, was bisher in keiner Weise hat erwiesen werden können, ist vorläufig doch nicht der weitergehenden Annahme beizuflichten, daß auch die als H-Donator und H-Acceptor auftretenden Verbindungen die gleichen sind. Beispielsweise müßten dann die Angehörigen der *Coli-Aerogenes*-Gruppe, für die neben den Fähigkeiten zur H_2-Aktivierung und -Entbindung aus Ameisensäure auch die zur heterotrophen CO_2-Fixierung festgestellt worden ist, in der Lage sein, unter autotrophen Bedingungen zu gedeihen. Wenn dazu auch bisher noch keine experimentellen Belege beigebracht worden sind, so geben die jüngsten Entdeckungen an sulfat- und nitratreduzierenden Bakterien doch begründeten Anlaß zu der Vermutung, daß Bedingungen hergestellt werden können, unter denen auch obligat „heterotrophe" Organismen unter H_2-Oxydation autotroph zu leben vermögen. Eine entsprechende Nachsuche unter Vertretern der *Coli-Aerogenes*-Gruppe dürfte zu der angeschnittenen Frage unter Umständen entscheidend beitragen können.

Unter welchem Blickwinkel die Diskussion über den molekularen Wasserstoff im Stoffwechsel der Mikroorganismen auch geführt werden mag, auf allen Gebieten eröffnen sich dem Bearbeiter Fragestellungen, die mit den zentralen Problemen der gegenwärtigen Forschung eng verknüpft sind.

Literatur.

Back, K. J. G., J. Lascelles and J. L. Still: Austral. J. Sci. Res. **9**, 25 (1946). — Billen, D.: J. Bacter. **62**, 793 (1951). — Boitschenko, E. A.: Dokl. Akad. Nauk. USSR N. S. **70**, 1037 (1950). — Bovarnick, M.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **47**, 191 (1941). — Bregoff, H. M., and M. D. Kamen: J. Bacter. **63**, 147 (1952). — Arch. of Biochem. a. Biophysics **36**, 202 (1952). — Brown, R. W., O. L. Osborn and C. H. Werkman: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **36**, 203 (1934). — Brown, A. H., and A. W. Frenkel: Ann. Rev. Biochem. **22**, 423 (1953). — Burk, D.: J. Physic. Chem. **35**, 432 (1931). — Butlin, K. R., M. E. Adams and M. Thomas: J. Gen. Microbiol. **3**, 46 (1949). — Butlin, K. R., and R. E. Adams: Nature (Lond.) **160**, 154 (1947).

Cardon, B. P., and H. A. Barker: Arch. of Biochem. a. Biophysics **12**, 165 (1947).

Farkas, A. L., and J. Yudkin: Proc. Roy. Soc. Lond. **115**, 373 (1934). — Farkas, L., and E. Fischer: J. of Biol. Chem. **167**, 787 (1947). — Foster, J. W.: in Werkman, C. H., u. P. W. Wilson, Bacterial Physiology, S. 381. New York 1951. — Frenkel, A., H. Gaffron and E. H. Battley: Biol. Bull. **97**, 269 (1949); **99**, 157 (1950). — Frenkel, A. W.: Arch. of Biochem. a. Biophysics **38**, 219 (1952). — Frenkel, A. W., and C. Rieger: Nature (Lond.) **167**, 1030 (1951).

Gaffron, H.: Biochem. Z. **275**, 301 (1935). — Amer. J. Bot. **27**, 273, 204 (1940). — J. Gen. Physiol. **26**, 195, 241 (1942). — Gaffron, H., u. J. Rubin: J. Gen. Physiol. **26**, 219 (1942). — Gaffron, H.: J. Gen. Physiol. **28**, 269 (1945). — Gest, H.: J. Bacter. **63**, 111 (1952). — In Phosphorus metabolism II, 522 (1953). — Gest, H., and M. D. Kamen: Science (Lancaster, Pa.) **109**, 558 (1949). — Gest, H.,

M. D. Kamen and H. M. Bregoff: J. of Biol. Med. **182**, 153 (1950). — Gest, H., and M. Gibbs: J. Bacter. **63**, 661 (1952). — Glover, J., M. D. Kamen and H. van Genderen: Arch. of Biochem. a. Biophysics **35**, 384 (1952). — Green, D. E., and L. H. Stickland: Biochemic. J. **28**, 898 (1934). — Green, M., M. Alexander and P. W. Wilson: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **82**, 361 (1953). — Green, M., and P. W. Wilson: J. Bacter. **65**, 511 (1953). — Grohmann, G.: Zbl. Bakter. II. **61**, 256 (1924). — Grunberg-Manago, M., M. J. Szulmajster and A. Prouvost: C. r. Acad. Sci. (Paris) **233**, 1690 (1951).

Hobermann, H. D., and D. Rittenberg: J. of Biol. Chem. **147**, 211 (1943). — Hoogerheide, J. C., and W. Kocholaty: Biochemic. J. **32**, 949 (1938). — Hyndman, L. A., R. H. Burris and P. W. Wilson: J. Bacter. **65**, 522 (1953).

McIlwain, H.: J. Gen. Microbiol. **2**, 288 (1948). — Immendorf, H.: Landw. Jahrb. **21**, 281 (1892).

Joklik, W. K.: Austral. J. Exper. Biol. a. Med. Sci. **28**, 321 (1950).

Kalnitzky, G., and C. H. Werkman: Arch. of Biochem. a. Biophysics **2**, 113 (1943). — Kamen, M. D., and H. Gest: Science (Lancaster, Pa.) **109**, 560 (1949). — Phosphorus Metabolism II, 506 (1952). — Kaserer, H.: Zbl. Bakter. II, **16**, 681 (1906); **15**, 573 (1906). — Kempner, W.: Biochem. Z. **257**, 41 (1933). — Kluyver, A. J.: Some aspects of nitrate reduction. Symposium, Rom 1953. — Kluyver, A. J., u. H. J. L. Donker: Chem. Zelle u. Gewebe **13**, 134 (1926). — Kluyver, A. J., u. A. Manten: Antonie van Leeuwenhoek **8**, 71 (1942). — Kluyver, A. J., and C. G. T. P. Schnellen: Arch. of Biochem. a. Biophysics **14**, 57 (1947). — Kohlmiller, E. F., and H. Gest: J. Bacter. **61**, 269 (1951). — Korkes, S., and E. R. Stadtman: Phosphorus Metabolism II, 502 (1952). — Kubowitz, F.: Biochem. Z. **274**, 285 (1934).

Lascelles, J., and J. L. Still: Austral. J. Exper. Biol. a. Med. Sci. **24**, 37 (1946). — Lebedeff, A. F.: Biochem. Z. **7**, 1 (1908). — Ber. dtsch. bot. Ges. **27**, 598 (1909). — Lee, S. B., u. W. W. Umbreit: Zbl. Bakter. II, **101**, 354 (1940). — Lee, S. B., G. B. Wilson and P. W. Wilson: J. of Biol. Chem. **144**, 273 (1942). — Lee, S. B., and P. W. Wilson: J. of Biol. Chem. **151**, 377 (1943). — Ley, J. de: Enzymologia **14**, 296 (1951). — Lichstein, H. C., and R. B. Boyd: J. Bacter. **62**, 415 (1951). — Arch. of Biochem. a. Biophysics **44**, 475 (1953). — J. Bacter. **65**, 617 (1953). — Lindstrom, E. S., R. H. Burris and P. W. Wilson: J. Bacter. **58**, 313 (1949). — Lindstrom, E. S., S. R. Tove and P. W. Wilson: Science (Lancaster, Pa.) **112**, 197 (1950). — Lindstrom, E. S., S. M. Lewis and M. J. Pinsky: J. Bacter. **61**, 481 (1951).

Morita, S., K. Suzuki and Sh. Takashima: J. of Biochem. (Tokyo) **38**, 255 (1951). — Mortensen, L. E., and P. W. Wilson: J. Bacter. **62**, 513 (1951).

Nabokich, A. J., u. A. F. Lebedeff: Zbl. Bakter. II, **17**, 350 (1907). — Nakamura, H.: Acta phytochim. (Tokyo) **9**, 189 (1937); **10**, 211 (1937); **10**, 259 (1937); **11**, 239 (1938); **11**, 109 (1938). — Nakamura, H., u. S. Yamagata: Acta phytochim. (Tokyo) **10**, 297 (1937). — Newton, J. W., u. P. W. Wilson: Antonie van Leeuwenhoek **19**, 71 (1952). — van Niel, C. B.: in Franck, J., u. W. E. Loomis, Photosynthesis in plants, S. 437. Iowa 1949. — Niklewski, B.: Extr. du Bull. de l'Acad. des sciences de Cracovie **91**, 1 (1906). — Zbl. Bakter. II, **20**, 469 (1908); **40**, 430 (1914). — Jb. wiss. Bot. **48**, 113 (1910).

Ordal, E. J., u. H. O. Halvorson: J. Bacter. **38**, 199 (1939).

Pappenheimer, A. M., and E. Shaskan: J. of Biol. Chem. **155**, 265 (1944). — Phelps, A. S., and P. W. Wilson: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **47**, 473 (1941). — Pirson, A.: Naturwissenschaften **37**, 241 (1950). — Fortschr. Bot. **14**, 289 (1953). — Popoff, L.: Pflügers Arch. **10**, 113 (1875). — Postgate, J.: J. Gen. Microbiol. **5**, 725 (1951).

Rauen, H. M., u. L. Jaenicke: Z. physiol. Chem. **293**, 46 (1953). — Rippel-Baldes, A.: Arch. Mikrobiol. **17**, 166 (1952). — Roelofsen, L. A.: Proc. Kon. Ned. Acad. van Wetensch. **37**, 660 (1934). — Rosenblum, E. D., and P. W. Wilson: J. Bacter. **59**, 83 (1950). — Ruhland, W.: Ber. dtsch. bot. Ges. **40**, 108 (1922). — Jb. wiss. Bot. **63**, 321 (1924).

Saussure, Th. de: Mem. de la Soc. de phys. et d'hist. nat. de Genève **8**, 163 (1839). — Schatz, A.: J. Gen. Microbiol. **6**, 329 (1952). — Schatz, A., u. C. Bovell: J. Bacter. **63**, 87 (1952). — Schlegel, H. G.: Arch. Mikrobiol. **18**, 362 (1953). — Flora (Jena) **140**, 499 (1953). — Senez, J., u. B. E. Volcani: Ber. wiss. Bot. **79**, 193 (1952). — Siegel, J. M., and M. D. Kamen: J. Bacter. **61**, 215 (1951). — Sisler, F. D., and C. E. Zobell: J. Bacter. **60**, 747 (1950). — Science (Lancaster, Pa.) **113**, 511 (1951). — Smith, G. N., and R. O. Marshall: Arch. of Biochem. a. Biophysics **39**, 395 (1932). — Smith, G. N., R. J. Emerson, L. A. Temple and T. W. Galbraith: Arch. of Biochem. a. Biophysics **46**, 22 (1953). — Ssorokin, J. J.: Dokl. Akad. Nauk. SSSR (N. S.) **90**, 897 (1953). — Stadtman, E. R., and H. A. Barker: J. of Biol. Chem. **180**, 1117 (1949); **181**, 221 (1949). — J. Bacter. **62**, 269 (1951). — Stephenson, M.: Ergebn. Enzymforsch. **6**, 139 (1937). — Antonie van Leeuwenhoek **12**, 33 (1947). — Stephenson, M., u. L. H. Stickland: Biochemic. J. **25**, 205 (1931); **25**, 215 (1931); **27**, 1517 (1933). — Stephenson, M., and D. D. Woods: in Bamann, E., u. K. Myrbäck, Methoden der Fermentforschung **III**, 2334. Leipzig 1941. — Stern, K.: Pflanzenthermodynamik. Berlin 1933. — Stickland, L. H.: Biochemic. J. **25**, 1543 (1931).

Tausz, J., u. P. Donath: Z. physiol. Chemie **190**, 141 (1930).

Umbreit, W. W.: in Sumner, J. B., u. K. Myrbäck. The Enzymes II, **1**, 329 (1950).

Vinogradov, A. P., E. A. Boitschenko u. V. I. Baranov: Dokl. Akad. Nauk. SSSR. **78**, 327 (1951).

Warburg, O.: Schwermetalle, S. 157. Berlin 1948. — Waring, W. S., and C. H. Werkman: Arch. of Biochem. a. Biophysics **1**, 300 (1942). — Wassink, E. C.: Enzymologia **10**, 257 (1942). — Wassink, E. C., E. Katz u. R. Dorrestein: Enzymologia **10**, 285 (1942). — Wassink, E. C., J. E. Tjia u. J. F. G. M. Wintermans: Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch. **52**, 412 (1949). — Wessler, S., and C. S. French: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **13**, 327 (1939). — Wieland, H., u. H. J. Pistor: Liebigs Ann. **522**, 116 (1936). — Wieringa, K. T.: Antonie van Leeuwenhoek **3**, 263 (1936). — Wight, K. M., and R. L. Starkey: J. Bacter. **50**, 238 (1945). — Wilson, P. W., u. W. W. Umbreit: Arch. Mikrobiol. **8**, 440 (1937). — Wilson, J. B., S. B. Lee and P. W. Wilson: J. of Biol. Chem. **144**, 265 (1942). — Wilson, P. W., R. H. Burris and W. B. Coffee: J. of Biol. Chem. **147**, 475 (1943). — Wilson, J. B., and P. W. Wilson: J. Gen. Physiol. **26**, 277 (1943). — Wilson, P. W.: Adv. Enzym. **13**, 345 (1952). — Wilson, E., H. A. Stout, D. Powelson and H. Koffler: J. Bacter. **65**, 283 (1953). — Woods, D. D.: Biochemic. J. **29**, 640 (1936); **32**, 2000 (1938). — Woods, D. D., and C. E. Clifton: Biochemic. J. **31**, 1774 (1937). — Wyss, O., and P. W. Wilson: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **27**, 162 (1941).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 323—342 (1954).

(Istituto di Microbiologia Agraria e tecnica Università Perugia.)

Les Agents de la Fermentation Vinaire*.

Par

TOMMASO CASTELLI.

Avec 2 figures dans le texte.

(Eingegangen am 8. Januar 1954.)

Les connaissances relatives aux agents de la fermentation vinaire se sont développées parallèlement à celles des levures, de sorte que nous puissions les répartir en 3 périodes.

La première période, qui s'étage des observations de DESMAZIÈRES à PASTEUR et à HANSEN, a été certainement remarquable, très riche d'acquisitions utiles et c'est la personalité du savant danois qui la domine. C'est dans cette période qu'on établit les bases de l'étude des levures, que l'on décrit les plus importants procédés de fermentation et que l'on fixe une technique qui reste de nos jours partiellement valable. La seconde période concerne surtout la cytologie des levures, et c'est à GUILLIERMOND qu'est due une place prépondérante. La troisième période peut être vraiment considérée comme celle de la génétique des levures; des études de KRUIS et SATAWA on revient encore à l'école de Carlsberg, où, auprès de WINGE, débute la phase proprement moderne de nos connaissances.

Le peu de temps mis à ma disposition, m'empêche de fournir le résumé même le plus bref de l'histoire du développement des connaissances relatives aux levures. Je n'ai pas cette intention; ce ne serait que répéter des faits et des jugements que les spécialistes connaissent parfaitement. Je m'arrêterai plutôt aux applications ou aux tentatives d'application pratique qui ont toujours fait suite aux connaissances théoriques.

En effet, il faut reconnaître que la plupart des chercheurs qui se sont occupés de la question vivaient dans des régions, où la vigne n'était pas intensivement cultivée et où, certes, la production vinaire n'était pas d'une importance économique considérable. Par contre, dans ces mêmes régions, la boisson la plus répandue était et reste encore la bière, c'est pourquoi il s'ensuit logiquement que les applications pratiques relatives aux connaissances qui au fur et à mesure se développèrent sur les levures se sont fortement orientées vers la production d'un tel produit. Toutefois le fait qu'il paraît impossible d'établir une comparaison convenable entre la bière et le vin — excepté au moment de leur fermentation ne peut échapper à personne.

* Rapport présenté au VI° Congrès International de Microbiologie. Rome 6.—12. Septembre 1953.

On doit, en effet, considérer la bière comme un produit tout à fait industriel puisque la matière dont elle provient peut être obtenue toujours avec la même composition, pasteurisée, stérilisée, et que sur cette matière on inocule en quantité déterminée, une variété d'espèces de levures bien définie. Le vin est obtenu au contraire d'un moût de raisin et ce produit possède une composition très différente qui dépend non seulement des régions, mais des conditions variables selon les diverses années et surtout selon le cours des saisons.

Le moût de raisin, contrairement au décocté de malt, contient naturellement les microorganismes provoquant sa fermentation. Le vin, contrairement à la bière, est produit seulement en partie dans des établissements, tandis que la quantité la plus importante en est obtenue par les soins de cultivateurs petits ou moyens qui rarement disposent de l'outillage nécessaire.

Tout le monde sait que la fermentation vinaire débute par l'action de levures de forme apiculée et que, dans la suite du développement, apparaissent des cellules ovales, elliptiques allongées, qui successivement l'emportent sur les premières. En effet, on sait depuis longtemps que le moût de raisin déclanche la fermentation grâce au *Sacch. apiculatus* (qu'aujourd'hui nous appelons *Kloeckera apiculata*) et nous ajoutons qu'elle est conduite à son terme grâce au *Sacch. ellipsoideus*. En réalité, de nombreux auteurs ont encore observé d'autres formes des levures dans le moût en fermentation, mais sans y attribuer une action quelconque, et, comme il était arrivé pour quelques espèces qui infectaient le moût de la bière, on désigne ces formes par le terme douteux de levures sauvages.

En réalité, même actuellement, celui qui examine au microscope des moûts de raisin en fermentation, quelque soit leur provenence et leur constitution, se trouve devant le même phénomène. Au début on observe des blastomycètes en forme de citron tandis qu'apparaissent successivement des formes arrondies, ovales, elliptiques qui après quelque temps acquièrent une prédominance absolue. Il est logique que tous les investigateurs, même les premiers qui aient pris intérêt à la question, se sont souciés, non seulement d'isoler ces formes et d'en donner des descriptions correspondantes, mais d'étudier leur pouvoir fermentatif dans le but d'en retirer quelque utilité du point de vue pratique.

Je ne veux pas m'étendre sur les recherches que fit Müller-Thurgau[1]; on les connaît toutes. Voici un court exposé de leurs résultats: la levure de forme elliptique fournit de grandes quantités d'alcool avec peu de produits secondaires, inversement la levure de forme apiculée fournit une minime quantité d'alcool et les produits secondaires sont importants.

Müller-Thurgau soutenait aussi que la levure apiculée, grâce à sa conduite biochimique, pouvait exercer une fâcheuse action sur l'activité normale de la levure elliptique au cours de la fermentation. D'où la conclusion: on retire les levures de forme apiculée de la fermentation du moût de raisin ou, plus exactement, on crée les conditions les plus favorables afin que le moût de raisin soit transformé par les seules levures elliptiques.

C'est à partir de ce moment-là qu'on commence à parler, en oenologie, de fermentation par «races pures». Il est naturel qu'un très grand nombre d'expérimentateurs en France, en Allemagne et en Italie se soient interessés à la question et aient tenté de confirmer les résultats de Müller-Thurgau par leurs propres recherches.

Aussi l'habitude d'utiliser des levures pures commence-t-elle à se répandre; comme il arrive presque toujours, aux premiers résultats presque enthousiasments s'ajoutent des indications absolument négatives; plusieurs soutiennent que l'usage des cultures pures en oenologie devait être limité à quelques cas particuliers pour l'obtention de certains milieux.

Que ces faits s'expliquent normalement par la connaissance insuffisante que l'on avait de la biologie des levures, et surtout par la hâte que l'on eut dans l'application à tous les cas des résultats obtenus dans certaines conditions particulières, voilà ce que nous semblent prouver les recherches effectuées par la suite.

Ainsi de'Rossi[2] en Italie et Martinand[3] en France ne purent confirmer complètement les résultats obtenus par Müller-Thurgau; il est intéressant d'observer que ces auteurs travaillèrent sur des moûts provenant de localités assez ressemblantes: le premier ayant effectué ses recherches sur les moûts des coteaux de l'Ombrie, l'autre sur ceux de la Moselle. Les deux auteurs soutiennent qu'on ne doit pas affirmer que les vins obtenus par fermentation des seules levures elliptiques soient meilleurs que ceux obtenus par la fermentation naturelle.

Les recherches de de'Rossi démontrèrent clairement que le terme «apiculé» avait un sens très vague et que les levures en forme de citron qu'il avait rencontré dans les moûts de l'Ombrie devaient se rapporter à plusieurs espèces dont l'une, dénommée *Pseudosaccharomyces magnus* (aujourd'hui «*Kloeckera magna*»), était capable de former une bonne quantité d'alcool possédant un pouvoir fermentatif de 8—10°.

Martinand soutint que dans les moûts de la Moselle, outre les levures de forme apiculée et elliptique, on rencontre un certain nombre de levures différentes aux dimensions plutôt petites, de forme quasi-sphérique, aux cellules groupées, qu'il désigna par le terme générique de «*Torula*».

Quoiqu'il en soit, le commerce des dites «levures sélectionnées» connut une certaine diffusion et, il faut le dire, produisit une impression de méfiance auprès des producteurs de vin. Je me rapporte à ce qui arriva en Italie:

Ils se servaient de matériaux conservés dans des bonbonnes, donc de produits qui ne pouvaient fournir aucune garantie, soit à l'égard du germe qu'ils contenaient soit à l'égard de leur état de pureté et d'activité. Je dois même ajouter qu'on a essayé de propager la vente de ces produits, non seulement en les recommandant particulièrement pour la préparation des vins blancs ou des vins rouges, mais au surplus on mettait sur les étiquettes des noms de vins fameux: à vous faire croire qu'il aurait suffit d'additionner un type donné de levure à un moût quelconque pour avoir un vin de qualités définies et particulières.

Il est normal qu'avec ces systèmes, non seulement on a surpris la bonne foi de quelques agriculteurs crédules, mais on est aussi parvenu

à produire un vif sentiment de défiance envers un traitement qui, en oenologie, à une raison d'être très fondée.

Il y a longtemps qu'on parle de l'emploi des levures sélectionnées, et non pas seulement en Italie; mais on pourrait bien se poser la question suivante: comment s'est effectuée cette sélection?

Dans notre cas, le terme «sélection» est adopté dans un sens très large. Nous savons qu'un choix sera d'autant plus judicieux que le nombre sur lequel il se portera sera plus élevé, surtout si la matière sur laquelle s'exerce ce choix est de diverses provenances. Mais où sont les travaux qui justifient la possibilité de faire ce choix?

Jusqu'à ces vingt dernières années ils étaient presque inexistants; je ne discute pas qu'il ait pu y avoir des hommes de laboratoire ou de technique capables d'isoler, à partir des moûts en fermentation, des souches de levures pouvant fournir d'excellents résultats dans l'industrie. Toutefois, il s'agissait de faits absolument sporadiques qui ne pouvaient nous permettre de parler, en oenologie, de l'emploi de levures sélectionnées. Ces idées sont d'ailleurs entièrement partagées par les chercheurs français.

Tout récemment Peynaud[4] écrivait: «En France, où pourtant on peut dire que l'étude des levures a été commencée, où nous avons eu des spécialistes éminents comme Guilliermond, les levures de vin n'ont jamais été étudiées spécialement dans leur ensemble. Nous n'avons rien à opposer aux nombreux travaux italiens de l'école de Castelli, de Pérugia et de Verona de Pisa. Le problème a été seulement abordé par Jean Renaud, un élève de Guilliermond, pour les vins du Val de la Loire[5]. Au fond, il faut bien l'avouer, nous ne connaissons pas les levures qui font nos vins, ou nous les connaissons bien mal, et ne les connaissant pas, nous ne pouvons prétendre savoir les utiliser. C'est cette lacune que nous avons voulu combler et nous avons commencé en 1951 l'étude des levures du Medoc.»

Dans une communication «Les agents de fermentation du vin et l'influence du milieu», présentée au IX° Congrès des Industries Agricoles, Genevois[6] traite le sujet d'un point de vue exclusivement bio-chimique. Barret et Bidan[7] présentèrent aussi un ouvrage qui ne repose pas sur des bases biologiques plus larges.

Je désire maintenant faire un exposé rapide de ce qui a été réalisé à l'Istituto di Microbiologia agraria e tecnica dell'Università di Perugia. Je voudrais démontrer que, si, jusqu'à ces dernières années, nous ne pouvions parler en oenologie de l'usage des levures sélectionnées, aujourd'hui nous en avons la possibilité. Bien plus, nous pouvons même parler avec certitude des levures de milieu.

On peut considérer que les recherches minutieuses sur la question ont été commencées au cours de la vendange de 1933 lorsque de'Rossi[5], chargé par la Commission technique des études relatives à la viticulture et à l'oenologie, analysa 87 moûts prélevés dans chaque localité de la région de l'Umbria et parvint à isoler 373 cultures de blastomycètes.

Je me propose de m'étendre davantage sur ce point; car ce travail fixa une technique qui a été toujours suivie par la suite. Notre but n'a

pas été de faire des études descriptives des formes des levures qu'on peut trouver dans les moûts en fermentation; nous avons voulu pratiquer l'isolement et par la suite étudier ces formes qui, par le fait qu'on les rencontre en nette prédominance aux divers moments de la fermentation, doivent être reconnues comme agents du processus fermentatif. Dans ce but, nous avons cru indispensable d'effectuer dans la mesure du possible les recherches directement sur place et d'y monter un laboratoire provisoire au lieu de recevoir le matériel à Perugia.

Nous avons analysé les moûts et non les raisins parce qu'ils représentent mieux la constitution chimique et biologique moyenne de la production de la vigne. Les moûts sont prélevés directement sur des fouloirs ou des pressoirs ou des bassins et des cuves de fermentation. Autant qu'il a été possible, nous avons essayé de prélever des moûts à peine obtenus du foulage du raisin et auxquels on n'a ajouté ni sulfite ni d'autres substances; mais souvent nous n'avons pu éviter ce fait.

Dans quelques cas, à dessein, on a prélevé des moûts sulfités ou chargés d'autres substances. Lorsqu'on montait un laboratoire provisoire sur place, l'analyse était effectuée quelques heures après le prélèvement de l'échantillon; quand les recherches étaient conduites à Perugia, on se souciait d'entreprendre l'analyse au moins dans les 24 heures qui suivaient le prélèvement. Afin d'isoler les formes prédominantes dans les diverses phases de la fermentation, on réalisait trois analyses, une première au moment où le moût n'était pas entré en fermentation ou lorsque cette dernière n'avait pas dépassé son premier stade; la seconde dans les 4 jours suivants, c'est-à-dire lorsque la phase tumultueuse était en plein développement; et la troisième, dans les 8 jours suivants lorsqu'on pouvait considérer terminée la phase tumultueuse. On commençait chaque analyse par l'examen microscopique du moût, disposant des préparations que l'on colorait au Ziehl dilué.

Immédiatement, on préparait des cultures d'isolement par dissémination en utilisant comme matière solidifiante la gélatine au moût de raisin obtenue en mélangeant, au moment de l'emploi, des parties égales de moût de raisin et de la gélatine à l'eau dans une double concentration (20%) de colle de poisson. Je désire encore plaider en faveur des milieux gélatinés contre les milieux gélosés et particulièrement du moût de raisin gélatinisé. Ce substratum est considérablement sélectif et les colonies se présentent d'une façon très caratéristique, soit pour leur forme, soit pour le pouvoir de liquéfaction de la gélatine et de la production éventuelle de pigments. Dans notre cas, une bonne différentiation des divers types de colonies se révèle être d'un grand secours, car, comme nous l'avons déjà dit, nous nous sommes seulement proposés de faire l'isolement et l'étude de ces formes qui, en se présentant en excès aux divers moments, doivent être considérées comme responsables de la fermentation normale et naturelle. Chaque échantillon de moût et chaque analyse nécessitait trois plaques de Petri avec la gélatine du moût de raisin. Le développement suffisant des colonies, propre à la réalisation de l'isolement, s'obtenait, à la température ambiante de 16°, dans le delai de 5—6 jours et le repiquage, précédé d'un scrupuleux examen macroscopique, des colonies développées sur la deuxième et troisième plaque. Sur la première plaque, qui naturellement offre un developpement très important de colonies et qui, par conséquent, ne peut être utilisée pour la pêche, on réalisait des préparations par impression. En déposant à la surface de la gélatine une lamelle et en exerçant une très faible pression, on parvient à faire adhérer au verre un assez bon nombre de

colonies presque intègres et, une fois la préparation colorée, on observe, à un fort grossissement, les cellules qui constituent chaque colonie. L'idée de prédominance qui guidait le choix des colonies s'était acquise par l'examen microscopique des moûts aussi bien que par l'examen macroscopique des colonies développées sur la deuxième et troisième plaque ou encore par l'observation des préparations par impression. Ainsi, après avoir déterminé la prédominance, on passe au repiquement et, dès qu'on possède les cultures pures, on procède à leur identification selon la technique la plus récente.

Les caractéristiques microscopiques et coloniaires étaient déduites d'après l'examen de jeunes cultures développées sur moût de bière, moût de raisin, gélose de malt et milieu Gorodkowa.

Nous recherchions la capacité des levures à former des spores dans les mêmes cultures sur malt gélosé et Gorodkowa; sur les dernières qui ne présentaient pas de spores nous faisions l'épreuve sur des blocs de plâtre ou sur la gélatine de silice. Le pouvoir de liquéfaction de la gélatine était déterminé en cultures piquées dans la gélatine du moût de raisin et, pour toutes les cultures, on déterminait le pouvoir d'assimilation des nitrates ainsi que le pouvoir de développement en présence d'alcool éthilique comme seule source de carbone. On étudiait le pouvoir fermentatif des sucres sur des cultures de bouillon de viande au 2% de sucre mis dans des tubes avec petite cloche renversée selon le procédé Durham. On établissait, par pesée, la quantité d'alcool que pouvait produire chaque souche avec la technique suivante: dans un Erlenmeyer de 100 cc., 50 cc. de moût de raisin sucré étaient sterilisés à l'étuve de Koch pendant 40 minutes, sans éloigner le depôt coagulé ou précipité; après ensemencement avec la souche en examen, on bouchait l'Erlenmeyer avec une valvule de Müller à l'acide sulphurique. Avec des pesées successives on évaluait le dégagement de CO_2 et de l'alcool produit. Ce procédé, même si nous ne pouvons pas le considérer comme exact, donne des résultats très satisfaisants et correspondants aux données obtenues par la methode de distillation.

Sur beaucoup de souches on a réalisé d'autres déterminations, en particulier on appréciait la quantité d'acides volatiles produits.

Nous nous sommes servis, en grande partie, pour avoir des références systematiques, de l'ouvrage de Stelling-Dekker[9] pour les levures sporogènes et de ceux de Lodder[10] et Diddens-Lodder[11] pour les asporogènes et pour les levures filamenteuses. Sans vouloir discuter des questions de systématique, nous tenons à préciser qu'à notre avis les procédés de M.me Stelling-Dekker et de M.me Lodder s'accordent bien avec les faits et peuvent être sûrement acceptés, tandis que l'on doit réserver son avis sur les procédés suivis pour les asporogènes.

Nous ne croyons pas, d'ailleurs, qu'on puisse adopter les jugements suivis par Lodder et Kreger van Rij[12] dans leur volume récent «The Yeasts»; car nous croyons surement que, au lieu de simplifier, on y soulève les sujets les plus épineux. Le fait d'avoir réuni en un seul genre «*Saccharomyces*, *Torulaspora* et *Zygosaccharomyces*», de mettre pratiquement en un seul genre «*Candida*» toutes les levures filamenteuses et de maintenir valide, par contre, le genre *Brettanomyces*, représente pour nous un «tout» que nous n'apprécions pas.

C'est pour ces raisons que nous avons cru bon de ne pas modifier les procédés suivis jusqu'à présent. Quant aux levures filamenteuses non sporogènes, on peut assurer qu'elles son très rarement représentées dans les moûts de raisin en fermentation. Le tableau ci-dessous indique le schéma des diverses étapes du travail d'identification: dans la dernière

colonne on a résumé l'allure de la fermentation telle qu'elle résulte des trois analyses conduites.

Localité	Phase de la fermentation	Souches	Aspect de la colonie	Morphologie sur gélose moût de bière	Morphologie sur moût de raisin	Aspect de la culture sur moût de raisin	Aspect de la culture sur gélose moût de bière	Piqûre sur gélatine au moût de raisin	Sporification	Assimilation des nitrates	Développement en présence d'alcool	Fermentation du						Pouvoir fermentatif	Espèces	Allure de la fermentation
												Glucose	Galaktose	Maltose	Sucrose	Lactose	Raffinose			

Afin d'être le plus bref possible, j'ai réuni dans la table 1 toutes les recherches exécutées à l'Institut. Après avoir précisé le nom de la région et l'année où on a effectué la recherche, on rapporte les détails relatifs à l'auteur, au nombre des moûts pris en considération et des souches obtenues[1].

Table 1. *Nombre des souches isolées.*

Région	Année	Auteur	Moûts, examinés	Souches obtenues
Umbria	1933	de 'Rossi	87	379
Chianti	1936	Castelli	90	525
Chianti	1937	Castelli	10	63
Lazio	1939	Santarelli	22	194
Piceno	1946	Castelli	40	203
Orvieto	1947	Castelli	5	55
Marche (Sept.)	1948	Becci	15	125
Abruzzi	1948	Agrippa	10	60
Toscana (Rufina)	1952	Capriotti	17	328
Veneto (Trevise)	1949	Capriotti et Cantarelli	19	143
Veneto (Trentino et Alto Adige)	1951	Capriotti	40	565
Sicilia (Occ.)	1945	Castelli	5	60
Sicilia (Occ.)	1946	Caramazza	3	25
Sicilia (Occ.)	1948	Castelli	12	170
Sicilia (Occ.)	1952	Castelli et del Giudice	27	375
Puglia	1947	Castelli	31	363
Calabria	1950	Capriotti	26	447
Bordelais	1950	Cantarelli	10	142
Israël	1950	Castelli	10	163

En Italie, outre les travaux de notre école qui touchent la question, d'autres sont apparus, tels que la recherche de Verona et Luchetti[31] sur les moûts et les vins de Marche, de Florenzano[32] sur les moûts de Toscana, de Malan[33, 34] sur ceux du Piemonte et à nouveau de Verona[35] sur ceux de la Sardegna.

[1] Il s'agit d'une œuvre très complexe et elle a pu aboutir grâce aux fréquentes contributions fournies par le Conseil National de Recherches.

Les études consciencieuses de FLORENZANO et plus particulièrement celles de MALAN ont été poursuivies en réalisant les règles que notre Institut avait indiquées.

Bref, voici le résumé des conclusions qu'on peut tirer de ce travail. Il s'avère évident que les espèces de levures qu'on rencontre dans les moûts de raisin en fermentation sont en grande quantité; tandis que quelques-unes d'entre elles sont constamment présentées — et on doit donc dire qu'elles activent au moins la plus grande partie de la marche normale et naturelle de la fermentation — il en est d'autres qu'on retrouve rarement — on doit donc noter que leur présence est fortuite.

Cependant il y a d'autres espèces, asporogènes aussi bien que sporogènes, au pouvoir de fermentation élevé, moyen ou bas, dont le pourcentage de fréquence dans les moûts est loin d'être modeste, de sorte que leur intervention ne peut être exclue du processus normal et naturel de fermentation. Tel est le cas de diverses espèces à joindre au genre *Saccharomyces* telles que *Sacch. oviformis*, *Sacch. mangini*, *Sacch. bayanus*, *Sacch. italicus*, *Torulaspora rosei* et *Candida pulcherrima*.

Avec le même désir de concision, j'ai réuni dans la table 2 et dans la figure 1 les régions où l'on a conduit les recherches, reportant aussi le nombre des moûts choisis, puis les espèces de levures le plus fréquemment représentées, accompagnées de leur pourcentage de fréquence.

Table 2. *Les levures isolées.*

Région et nombre des moûts examinés	*Saccharomyces ellipsoideus*	*Kloeckera apiculata*	*Torulaspora rosei*	*Hanseniaspora guilliermondii*	*Saccharomyces bayanus*	*Saccharomyces oviformis*	*Kloeckera magna*	*Saccharomyces mangini*	*Saccharomyces italicus*	*Torulopsis pulcherrima*	*Saccharomyces uvarum*
Umbria 92	80	82	12,7	—	1,1	—	17	—	—	5,8	—
Toscana 103	72	87,1	19,7	—	6,4	2,1	4,3	1	1	17,2	11,8
Piceno 40	77,5	92,5	15	—	15	7,5	12,5	—	2	7,5	10
Marche sept. 15 . . .	73,5	100	13,3	—	13,3	6,6	20	—	—	13,3	—
Abruzzi 10	90	100	—	—	—	—	30	—	—	—	—
Lazio 22	90,9	100	40,9	—	22,7	13,6	13,6	—	4,5	4,5	13,6
Puglia 31	100	64,5	25,8	32,3	25,8	9,6	19,3	6,4	16,1	22,5	6,4
Sicilia occ. 12 (1948).	100	92	33	55	33	8,5	—	41	25	—	8,5
Calabria 26.	94,1	50	15	65	46	4	—	38	42	4	—
Sicilia occ. 27 (1952).	100	48	14,8	51,8	40,7	74	—	70,4	29,6	11,1	14,8
Israël 10	100	60	—	100	—	40	—	70	—	—	10
Treviso 19	100	94	16	—	5	5	—	21	5	—	5
Trentino 40	95	100	17,5	—	5	10	2,5	—	2,5	7,5	—

L'examen de la table indique que les deux espèces les plus répandues sont *Kloeckera apiculata* et *Sacch. ellipsoideus*, et, en même temps, d'une façon très claire que le pourcentage de fréquence, qu'on retrouve dans les moûts pour *Sacch. ellipsoideus*, augmente progressivement au fur et à mesure qu'on passe de l'Italie Centrale à l'Italie Méridionale et à la Sicilia.

Au contraire, on observe que pour *Kloeckera apiculata* la fréquence diminue en passant d'une zone au climat tempéré à une localité au climat chaud ou très chaud.

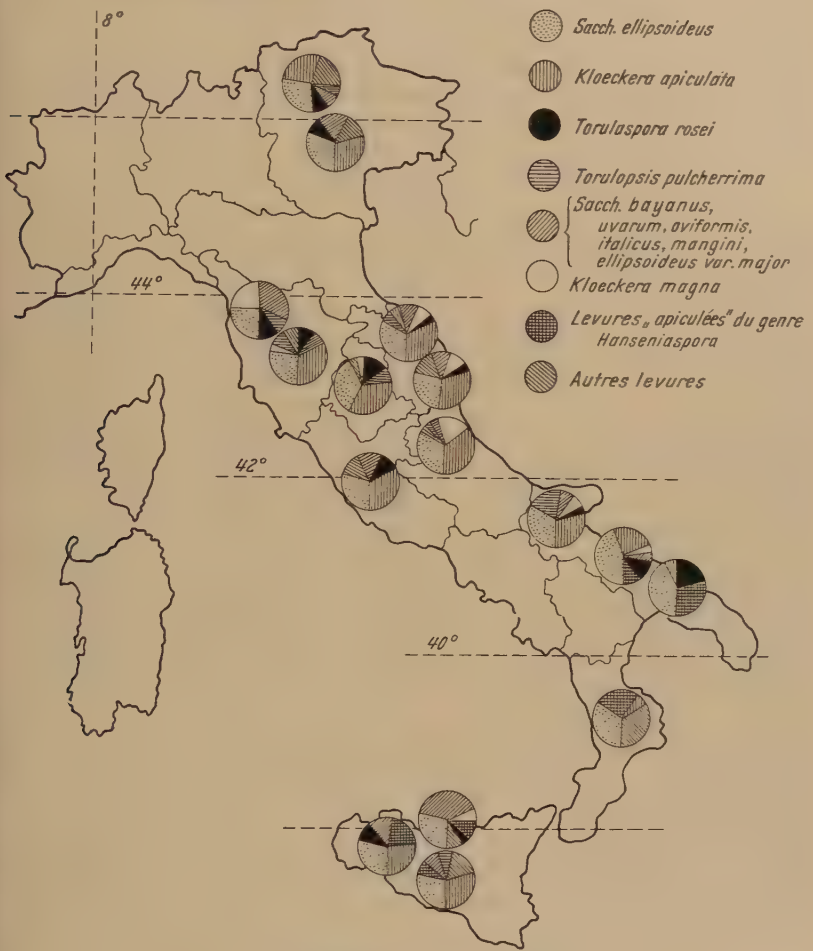


Fig. 1. Distribution des levures en Italie.

On rencontre les levures apiculées sporogènes assimilables au genre «*Hanseniaspora*» exclusivement dans le midi et le pourcentage de fréquence en augmente au fur et à mesure que la latitude décroît.

Kloeckera magna est une espèce qui semble avoir pour seul domaine l'Italie Centrale, tandis que *Candida pulcherrima* se trouve un peu partout en dépit d'une distribution plus grande dans les localités centrales.

Torulaspora rosei revêt un aspect qui ressemble de près à celui de *Sacch. ellipsoideus*, à savoir que sa fréquence croît lorsqu'on passe d'une localité tempérée à une localité chaude. Pour *Sacch. italicus*, *Sacch. bayanus* et *Sacch. mangini*, la même progressive augmentation est bien plus considérable.

La table 3 sert à démontrer clairement l'action du climat. Après avoir indiqué les localités où furent conduites les recherches, on ajoute le

Table 3. *Souches sporogènes et asporogènes.*

Région	Nombre souches isolées	Non sporogène	Sporogène
Umbria	379	188 (49,6%)	191 (50,4%)
Chianti (1936)	525	259 (49,3%)	276 (50,7%)
Chianti (1937)	63	32 (50,7%)	31 (49,3%)
Lazio	194	95 (48,9%)	99 (50,1%)
Piceno	203	114 (54,8%)	89 (45,2%)
Marche Sept.	125	88 (70,0%)	37 (30,0%)
Abruzzi	60	38 (63,3%)	22 (36,7%)
Vénéto (Trevise)	143	49 (32,2%)	94 (67,8%)
Vénéto (Trentino et Alto Adige)	554	228 (41,2%)	326 (58,8%)
Puglia Sept.	74	40 (53,3%)	34 (46,7%)
Locorotondo	35	22 (63,0%)	13 (37,0%)
Puglia Centrale	93	20 (21,4%)	73 (78,6%)
Puglia Méridionale	160	9 (5,6%)	151 (94,4%)
Calabria (haute colline)	149	38 (25,5%)	111 (74,5%)
Calabria (plaine côtière)	282	22 (7,8%)	260 (92,2%)
Sicilia occ. (1948)	170	38 (22,3%)	132 (77,6%)
Sicilia occ. (1952)	375	28 (7,2%)	347 (92,8%)

nombre des souches isolées en les distinguant (avec l'expression en chifre de pourcentage) dans les deux grands groupes de sporogènes et d'asporogènes.

Pour rendre la table le plus claire possible, on a distingué pour la région de Puglia une zone Septentrionale, Centrale, Locorotondo[1] et Méridionale, et pour la région de Calabria les localités en colline haute et en plaine littorale.

La table ne demande pas un long commentaire. On sait clairement que si, dans les localités du centre, le nombre des souches non sporogènes est presque identique à celui des sporogènes, l'aspect se transforme au fur et à mesure que l'on va vers les chaudes localités méridionales et siciliennes. Pour bien illustrer le phénomène, il faut comparer les résultats obtenus dans la région de Puglia et dans la région de Calabria.

[1] Locorotondo est une localité de la partie Méridionale de Puglia, mais située sur la colline à une altitude de 400 mètres au-dessus du niveau de la mer.

Dans la première, qui s'étend d'une manière considérable en latitude, nous pouvons considérer la zone septentrionale au climat peu chaud et où les pourcentages des sporogènes et des non sporogènes sont équivalents; la zone centrale où le pourcentage des sporogènes est de 78,6%, tandis que dans la zone, beaucoup plus chaude, du midi, le pourcentage des sporogènes atteint 94,4%.

A Locorotondo on observe, au contraire, une prédominance des non sporogènes; mais ce résultat confirme les faits observés, car le climat de Locorotondo est plûtot froid. Locorotondo se trouve dans une zone située à une altitude superieure à 400 mètres au-dessus du niveau de la mer.

Dans les deux zones calabraises prises en considération, les résultats obtenus sont encore plus significatifs. Dans toute Calabria, les espèces sporogènes ont la prédominance sur les asporogènes, mais les premières qui, dans les zones de hautes collines, représentent les 74,5% du total en représentent dans les zones plus chaudes de la plaine littorale les 92,2%.

Même les recherches poursuivies en Sicilia occidentale révèlent toujours une nette prédominance des espèces capables de produire des spores; les différences sensibles notées entre les pourcentages de fréquence: 77,65 en 1948 et 92,8% en 1952 peuvent s'expliquer par l'évolution très diverse des saisons dans les deux années.

Il est vrai qu'en 1948 en Sicilia les vendanges furent retardées par une saison particulièrement défavorable, des pluies continuelles et une basse température donnèrent des moûts d'une faible teneur en sucre et dont le processus de fermentation n'eut pas à craindre des températures élevées. En 1952, au contraire, à la suite d'une saison extrèmement sêche, les vendanges furent précoces, les moûts très sucrés et la température de fermentation absolument exceptionnelle.

Les recherches faites sur les moûts de l'État d'Israel permirent d'établir un pourcentage des sporogènes de 90,8%.

Si l'action du climat se manifeste très clairement dans les chiffres écrits jusqu'ici, on met en évidence un aspect encore plus net et catégorique lorsque la comparaison est limitée aux seules espèces de formes typiques apiculées.

Quelque soit la localité que nous prenions en considération, la fermentation naturelle des moûts de raisin est toujours amorcée par les levures de la forme typique du citron. Soulignons que, tandis qu'en Italie Centrale et Septentrionale celles-ci sont incapables de former des spores, donc à assimiler au genre *Kloeckera* Janke, au fur et à mesure qu'on passe aux zones chaudes et très chaudes de l'Italie Méridionale et de la Sicilia on rencontre aussi *Hanseniaspora* Zikes. D'ailleurs il est très net et les données de la table 4 le démontrent, que les levures apiculées

sporogènes deviennent de plus en plus abondantes, lorsqu'on passe des localités assez moyennement chaudes aux localités très chaudes. Je n'ai pas l'intention de revenir ici sur la vive discussion relative au pouvoir

Table 4. *Distribution de Kloeckera et Hanseniaspora.*

Région	Moûts examinés	Souches isolées	Asporogènes (*Kloeckera*)	Sporogènes (*Hanseniaspora*)
Puglia Sept.	7	22	22 en 7 moûts	0 en 7 moûts
Puglia Cent.	9	17	12 „ 7 „	5 „ 3 „
Locorotondo	4	17	17 „ 4 „	0 „ 4 „
Puglia Mér..	11	30	4 „ 3 „	26 „ 7 „
Calabria (haute colline) . . .	9	35	35 „ 9 „	0 „ 9 „
Calabria (plaine côtière) . . .	17	65	10 „ 4 „	55 „ 17 „
Sicilia occ. (1948)	12	51	34 „ 11 „	17 „ 7 „
Sicilia occ. (1952)	27	69	25 „ 13 „	44 „ 14 „
État d'Israél	10	62	8 „ 5 „	54 „ 10 „

à former des spores des levures apiculées communes, ni à rechercher si *Kloeckera* doit être considerée phase asporogène de *Kloeckeraspora*[36, 37, 38, 39].

Je répèterais plus volentiers les remarques suivantes: dans les localités à climat chaud et très chaud, les levures de forme apiculée rencontrées dans les moûts de raisin en fermentation sont pour la plupart sporogènes et à considérer comme étant du genre *Hanseniaspora* Zickes et surtout à assimiler à *Hanseniaspora Guilliermondii* Pijper.

Le genre *Hanseniaspora* est bien défini, parce que les spores ont un aspect très claire, se libèrent facilement de l'asque et présentent une forme caractéristique;

Table 5. *Pouvoir*

Régions	Nombre des souches isolées	Alcool,							
		0—1	1—2	2—3	3—4	4—5	5—6	6—7	7—8
		Nombre des							
Veneto . . .	141	0	5	12	18	9	3	1	3
Umbria . . .	378	6	2	0	16	90	37	0	7
Toscana . . .	525	27	5	10	29	109	90	6	0
Lazio	132	4	0	1	7	38	38	1	1
Piceno . . .	203	5	1	5	9	21	42	23	5
Puglia S. . .	74	3	6	1	11	10	1	0	1
Puglia C. . .	93	0	8	0	9	2	0	2	3
Puglia M. . .	160	3	0	1	2	3	5	13	13
Calabria C.. .	151	0	0	0	20	13	2	0	2
Calabria P. .	288	0	1	0	6	12	3	16	42
Sicilia	173	0	0	1	19	20	3	3	11

il ne peut avoir rien de commun avec le prétendu et hypothétique genre *Kloeckera-spora* Niehaus. Les levures apiculées sporogènes du genre *Hanseniaspora* avaient été trouvées par Bioletti[40], Cruess[41] et par Mrak et McClung[42] dans les fruits et dans les moûts de Californie. En Italie, en Europe, autant que je sache, elles n'avaient jamais été signalées; elles furent observées pour la première fois lors de nos recherches d'orientation en Sicilia pendant la vendange de l'année 1946; par la suite, comme je l'ai démontré, elles ont été trouvées, et en nombre considérable, dans les moûts des régions chaudes et très chaudes.

Nos connaissances du mécanisme de la fermentation des levures du genre *Hanseniaspora* sont très pauvres. Cantarelli[43] démontre que les levures du genre *Hanseniaspora* possèdent auprès des levures apiculées asporogènes du genre *Kloeckera* une remarquable thermophilie, préférant de plus les moûts de moyenne acidité et de toute façon d'acidité peu élevée. Dans l'ensemble, les expériences de fermentation suivies démontrent qu'il n'y a pas de profondes différences pour le bilan de fermentation entre les levures apiculées sporogènes at asporogènes. On peut les considérer comme des genres de capacité parallèles, le genre *Hanseniaspora* étant d'une activité à peine supérieure.

Jusqu'ici l'exposé met en valeur l'action du climat quand on veut établir, pour différentes localités, la supériorité de certaines espèces; il est logique, maintenant, de nous demander quelle conclusion nous pouvons déduire en vue d'une application de ces recherches. Nous avons dit que pour chaque culture isolée on a déterminé le pouvoir de fermentation, c'est-à-dire la quantité d'alcool que chaque souche était capable de produire. Eh bien, nous nous sommes attachés à dresser la table 5 où toutes les cultures isolées sont réunies en groupes, qui se classent par degrés en rapport avec leur pouvoir alcoolique. Avec les données à l'ordre de ce tableau on a construit des graphiques où, afin de tirer des comparaisons intéressantes, les souches isolées de chaque localité ont été rapporté à la valeur 100.

fermentatif des souches isolées.

Volume %										
8—9	9—10	10—11	11—12	12—13	13—14	14—15	15—16	16—17	17—18	18—19
Cultures										
2	8	24	21	18	9	5	1	0	0	0
33	21	2	0	89	73	1	1	1	0	0
3	6	6	14	23	36	112	48	1	0	0
9	9	6	5	24	40	9	1	1	1	0
4	7	9	3	12	28	16	4	2	1	0
7	1	0	0	2	8	11	10	2	0	0
1	4	0	0	0	11	20	24	8	0	1
4	2	2	7	13	33	26	14	14	4	1
2	3	4	9	16	37	29	11	2	0	0
15	9	8	12	26	35	49	33	15	3	2
6	11	5	4	8	8	15	25	21	6	4

Comme nous l'avons déjà fait, les résultats obtenus dans l'Italie Septentrionale et Centrale sont indiqués dans leur ensemble et pour les régions de Puglia en zones Septentrionale-Centrale et Méridionale, la Calabre en zones de coteaux et de littoral. Ces distinctions sont justifiées par l'action réciproque des deux facteurs, plus grande latitude et plus grande altitude. En Puglia la température est soumise au facteur latitude et en Calabria au facteur altitude.

Dans la table 5 l'on n'a pas mis les données se référant à quelques expériences réalisées en Italie Centrale et en Sicilia, parce qu'elles n'intéressent qu'une petite quantité de souches; il en est de même pour celles qui se rapportent au Alto Adige, les recherches à ce point de vue n'étant pas encore terminées, pour celles de Sicilia Occidentale en 1952 et celles de Rufina, actuellement en cours.

Examinons la table: tout d'abord les régions avec le nombre des cultures isolées, puis en regard les souches pour chaque pouvoir fermentatif.

L'examen des graphiques (fig. 2) est bien plus instructif; dans la table on observe, en général, deux maxima pour l'Italie Centrale: ils sont situés entre 3° et 5° et 12°—14°, pour régions Méridionales et pour Sicilia ils dépassent ces chiffres et atteignent entre 7°—8° et 15°—16°.

Il semble que pour les régions centro-septentrionales le premier maximum soit dû, plus qu'à toute autre chose, aux levures apiculées du genre *Kloeckera*, dans les localités où il fait chaud on l'attribuera aux apiculées sporogènes et aux *Hanseniaspora Guilliermondii*, où particulièrement le pouvoir fermentatif oscille entre 5° et 9°.

Quelques localités ont un troisième sommet beaucoup plus faible que les deux premiers: il est dû, dans l'Italie Centrale, à la présence de *Kloeckera magna* et *Torulaspora rosei*; dans l'Italie Méridionale on l'explique par la présence de *Torulaspora rosei* et surtout de *Hanseniaspora Guilliermondii*. Un examen attentif des souches de pouvoir fermentatif élevé permet de déceler un aspect extrèmement intéressant du point de vue pratique.

Le pouvoir fermentatif le plus haut, présenté par des souches isolées des moûts de la province de Trévis, est situé entre 15° et 16°; en Umbria, Toscana, Puglia Septentrionale et les localités des hautes collines de Calabria, il s'élève entre 16° et 17°; il monte entre 17° et 18°, au Lazio et en Piceno et atteint les valeurs maxima entre 18° et 19° dans le Puglia Centrale et Méridionale, dans les localités du littoral de Calabria et de Sicilia Occidentale.

Lorsqu'on recherche dans les différentes localités le mode d'expansion des souches à pouvoir de fermentation très élevé, on se trouve en face

de faits bien intéressants: par exemple, choisissons le pouvoir de fermentation entre 16° et 17°; il a été observé qu'il n'est valable pour

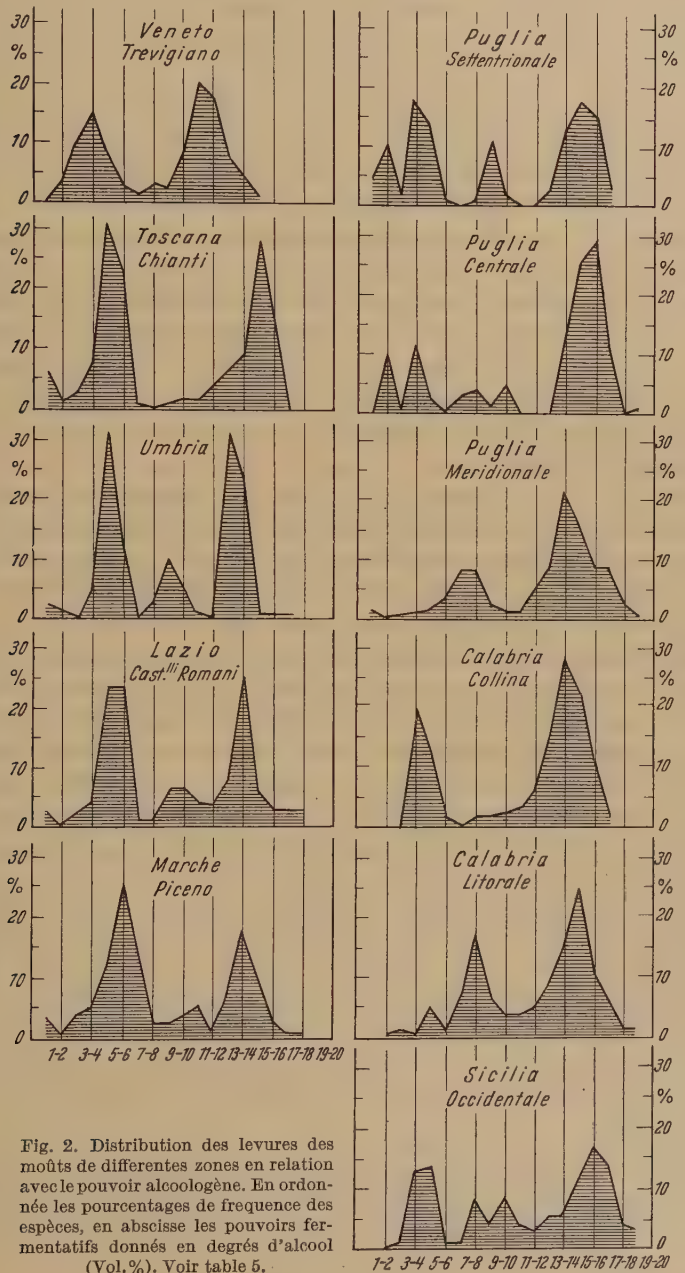


Fig. 2. Distribution des levures des moûts de differentes zones en relation avec le pouvoir alcoologène. En ordonnée les pourcentages de frequence des espèces, en abscisse les pouvoirs fermentatifs donnés en degrés d'alcool (Vol.%). Voir table 5.

aucune souche isolée des moûts d'Umbria, Toscana et Lazio, pour deux souches du Piceno, des Puglia Septentrionale et des localités d'altitude élevée de Calabria, tandis qu'en Puglia Centrale on en rencontre huit, quatorze dans le Puglia Méridionale, quinze dans la partie basse de Calabria et au moins vingt-et-un en Sicilia.

Cette revue assez vaste a démontré combien est complexe l'aspect biologique de la fermentation vinaire et il est catégoriquement influencé par le climat. Ce dernier opère une différenciation notable surtout par rapport aux espèces en jeu (et entre les souches même de chaque espèce).

Pour de très nombreuses cultures isolées — celles-ci même qui sont conservées dans notre collection de levures vinaires — le mécanisme chimique de la fermentation a été étudié spécialement par rapport à la production d'acides volatiles et d'autres composés, et nous avons trouvé de notables différences au sein d'une même espèce. Nous avons réalisé des expériences dans le but d'obtenir des procédés de fermentation à des températures très différentes[44]; mais ces recherches doivent être poursuivies et amplifiées.

Ainsi nous avons observé qu'il existe des cultures des *Sacch. ellipsoideus* isolées de Puglia et de Sicilia qui donnent de bonnes fermentations même à des températures relativement élevées, tandis que d'autres, issues surtout des moûts du Alto Adige, réussissent à fermenter d'une façon techniquement correspondante à température très basse.

Depuis bien longtemps déjà on utilise avec grande satisfaction quelques cultures de *Sacch. ellipsoideus* sur de forte quantités de moûts des localités chaudes et très chaudes de l'Italie. Pour les régions dont la température vendémiaire est plutôt basse, nous avons obtenu de bons résultats, toujours sur de grosses quantités de moûts, avec des souches de Lazio et de Veneto. Quelques essais faits au Laboratoire font prévoir que l'on devrait obtenir d'aussi bons résultats avec diverses souches venant des moûts du «Trentino». Nous avons l'intention de faire des essais, en Alto Adige, aux prochaines vendanges. Quelques souches de *Sacch. ellipsoideus*, choisis dans le groupe possédant un pouvoir de fermentation élevé, sont utilisées depuis longtemps sur des masses notables dans le procédé de seconde fermentation. Nous avons aussi acquis de bons résultats, soit avec des essais de laboratoire sous autoclaves de 10 litres, soit dans la fabrication des mousseux dans des grands récipients selon le procédé Charmat, grâce à quelques souches de *Sacch. ellipsoideus* et autres espèces.

L'Istituto di Microbiologia agraria e tecnica est aujourd'hui en mesure de fournir, pour les localités italiennes, des cultures particulièrement adaptées; car plus que du terme «selectionnées» elles peuvent se faire valoir du titre de levures de milieu.

Les remarques constantes qu'on rencontre dans les moûts de raisin en fermentation, parfois avec un bon pourcentage de fréquence des espèces assimilables à *Saccharomyces* ou à d'autre genres de levure, nous ont poussés a chercher s'il est possible de les utiliser pour la vinification.

On va particulièrement, entre toutes les autres espèces, à la *Torulaspora rosei* qui, d'un point de vue technologique, a un mécanisme chimique spécialement pur. Certaines souches de *Torulaspora rosei* possèdent un pouvoir de fermentation qui dépasse les 11° d'alcool en volume en donnant des teneurs d'acidité volatile extrêmement basses. Indiscutablement, les petites cellules rondes, réunies en petits groupes, moyennes productrices d'alcool, que MARTINAND signala dans les moûts de la Moselle et désigna du terme générique de *Torula* doivent être considérées comme des *Torulaspora rosei*.

En 1942, après une série d'analyses sur des vins obtenus par fermentation à partir de souches de *Torulaspora rosei*, j'ai voulu poser la question suivante: — Dans la vinification par cultures pures, devons-nous toujours nous accrocher aux cultures de *Sacch. ellipsoideus*[45]? Dans maintes localités italiennes et dans d'autres pays vinicoles, les moûts de raisin présentent des quantités bien modérées de sucre et les vins ne pourront jamais atteindre les 11 degrés d'alcool. L'usage, dans ces cas, de pieds-de-cuve préparés avec des cultures de *Torulaspora rosei*, permet d'obtenir des vins secs avec très peu d'acidité volatile. Sans détours, je dirai que depuis près de dix ans, la souche no. 63 de *Torulaspora rosei*, appartenant à notre collection, est employée en peu partout dans l'Italie, particulièrement au Nord, sur de grandes quantités et plus que tout autre pour l'obtention de vins blancs communs pour repas et fins à bouteille.

Je signale aussi que la préparation de pieds-de-cuve avec des cultures de *Sacch. oviformis* et *Sacch. globosus* avait été satisfaisante.

L'usage, en oenologie, de cultures associées n'a pas toujours fourni d'excellents résultats. D'abord, il est difficile de régler le développement de l'une de façon qu'elle ne forme pas un détriment des autres[46]. D'autre part de récentes recherches ont démontré que les fermentations dans un milieu pur étaient préférables aux combinaisons binaires, ternaires ou quaternaires[47]. VERONA[48, 49], depuis peu de temps, a proposé un procédé certainement intéressant que l'on pourrait nommer «par fermentations succesives»; on introduit d'abord dans le moût une culture de levure donnée et, après un certain délai de temps, on y en ajoute une seconde. Nous avons confirmé, chez nous, les résultats obtenus par VERONA: une telle fermentation, dans son developpement normal, se vérifie lorsqu'on pose une levure de fermentation préparée avec la *Torulaspora rosei* sur des moûts dont la teneur en sucre est élevée.

On obtient des vins avec des quantités d'alcool très supérieures à la capacité de la *Torulaspora rosei*. Encouragé par les résultats obtenus aux essais de laboratoire, j'ai conseillé au Dr. Cantarelli de l'Institut des Industries Agricoles de notre Université de les appliquer sur des grandes quantités. Aux vendanges de 1952, tant en Umbria qu'en Lazio, on a réalisé la vinification de plus de 15 milles Hectolitres en se servant des souches de Collection n.os 20 et 63, respectivement *Sacch. ellipsoideus* et *Torulaspora rosei*.

J'en tire les conclusions des résultats du travail même de Cantarelli[50]: «Par ces associations successives on a obtenu, avec une parfaite allure fermentative, une réduction considérable du taux d'acidité volatile, dont la *Torulaspora rosei* réduit l'accumulation initiale au moyen d'un mécanisme fermentatif particulièrement pur. Les additions successives de la levure elliptique ne semblent pas accroître une pareille production, mais néanmoins atteignent des taux de rendement d'alcool élevés.» Un grand intérêt général et pratique présenterait la création de formes hybrides à partir de souches des levures isolées des moûts de raisin et il est à prévoir qu'on pourrait obtenir des résultats bien profitables. La possibilité d'adapter les levures à l'anhydride sulfureuse est désormais établie; par contre, il semble que les formes ainsi traitées ne fournissent pas de meilleurs résultats que celles qui sont naturelles[51, 52, 53].

Maints et maints autres faits même récents pourraient attirer notre attention, en particulier sur ces formes filamenteuses de levures propres à la production de quelques types de vins — mais l'horloge me prive du plaisir de vous en entretenir.

Il me suffit de vous avoir rappelé quel est le travail que nous poursuivons depuis une vingtaine d'années et d'avoir souligné qu'on a conduit ces recherches en tâchant d'être dans toute la mesure possible très près à la réalité. De ce travail il résulte d'une manière évidente que le facteur milieu, qu'il soit considéré en tant que constitution chimique du moût ou en tant que climat de la région, exerce une action différenciatrice notoire parmi les espèces et sur le souches.

L'industrie oenologique, qui joue pour quelques nations méditerranéennes un rôle économique de premier ordre, revêt en Italie un aspect profondément social. Si les récentes découvertes de chimie et de physique et l'emploi d'un outillage toujours mieux approprié ont enfin communiqué un souffle salutaire à la production du vin, l'aspect microbiologique de cette industrie est, au contraire, resté presque volontairement négligé. Cependant nous nous sommes depuis longtemps appliqués à combler cette lacune, parfaitement convaincus que, si la naissance en conditionne toute la vie, c'est du processus fermentatif que naît le vin.

Zusammenfassung.

Es wird eine Übersicht über die von Verf. und anderen seit 1933 isolierten Hefestämme (über 4000 Stämme mit 11 Arten) aus italienischen Weinmosten gegeben. Am häufigsten sind vertreten *Saccharomyces ellipsoideus* und *Kloeckera apiculata*, jene von Norden nach Süden, diese von Süden nach Norden häufiger werdend. Ähnliche Unterschiede finden sich unter den übrigen Arten: *Sacch. mangini* und *italicus* z. B. sowie *Hansenula Guilliermondi* fehlen im Norden fast völlig, *Kloeckera magna* und *Torulopsis pulcherrima* verhalten sich umgekehrt.

Die sporogenen Hefen nehmen, im Gegensatz zu den asporogenen, nach Süden zu. In wärmeren Landschaften finden sich in den höheren Lagen mehr asporogene als in den tieferen Lagen.

Weiter wird die Gärkraft der isolierten Stämme (Vol% Alkohol) in Beziehung zu der Häufigkeit der Stämme in den einzelnen Landschaften gesetzt, woraus sich klimatisch bedingte Abhängigkeiten ergeben, die wiederum in Beziehung zu den jeweils vorherrschenden Arten stehen.

Zum Schluß werden Ausblicke auf künftige Möglichkeiten gegeben (Mischgärungen usw.), wobei die Verwendung von *Torulaspora rosei* mit ihrem hohen Alkoholbildungsvermögen und geringer flüchtiger Säure besonders erörtert wird.

Bibliographie.

[1] Müller-Thurgau, H.: Jahresb. d. Deutsch-Schweiz. Versuchstation in Wadensweil **5** (1894/95). — [2] de'Rossi, G.: Le Staz. Sper. Agr. Ital. **8** (1917). — [3] Martinand, V.: Revue de Vit. **32** (1909). — [4] Peynaud, E.: Rev. des Ferm. et des Ind. Alim. **7** (1952). — [5] Renaud, J.: Thèse Sciences Lib. Gen. Enseign. Paris 1941. — [6] Genevois, L.: Atti IX° Congr. Int. Ind. Agr. Roma 1952. — [7] Barret, A., et A. Bidan: Atti IX° Congr. Int. Ind. Agr. Roma 1952. — [8] de'Rossi, G.: Rapp. IV° Congr. Int. Vigne et Vin. Lausanne 1935. — [9] Stelling-Dekker, N. M.: Die Sporogenen Hefen. Amsterdam 1931. — [10] Lodder, J.: Die Anaskosporogenen Hefen (Erste Hälfte). Amsterdam 1934. — [11] Diddens, H. A., et J. Lodder: Die Anaskosporogenen Hefen (Zweite Hälfte). Amsterdam 1942. — [12] Lodder, J., et N. J. W. Kreger van Rij: The Yeast. Amsterdam 1952. — [13] Castelli, T.: Nuovi Annali dell'Agricoltura **19** (1939). — [14] Castelli, T.: Nuovi Annali dell'Agricoltura **19** (1939). — [15] Santarelli, D.: Annali Facoltà Agraria Perugia **1** (1942). — [16] Castelli, T.: Annali Facoltà Agraria Perugia **4** (1947). — [17] Castelli, T.: Riv. di Vit. e di Enol. Conegliano **2** (1949). — [18] Becci, M.: Tesi di Laurea in Scienze Agrarie Perugia 1949. — [19] Agrippa, M.: Tesi di Laurea in Scienze Agrarie Perugia 1949. — [20] Cantarelli, C., et A. Capriotti: Riv. di Vit. e di Enol. Conegliano **5** (1952). — [21] Capriotti, A.: Atti Accad. della Vite e del Vino **5** (1954). — [22] Capriotti, A.: Recherches en cours. — [32] Castelli, T.: L'Italia Agricola **9** (1947). — [24] Caramazza, I.: Annali Facoltà Agraria Perugia **4** (1947). — [25] Castelli, T.: Riv. di Vit. e di Enol. Conegliano **3** (1950). — [26] Castelli, T., et E. del Giudice: Riv. di Vit. e di Enol. Conegliano **6** (1954). — [27] Castelli, T.: Suppl. Ricerca Scientifica **17** (1947). — [28] Capriotti, Annali Facoltà Agraria Perugia **8** (1952). — [29] Cantarelli, C.: Recherches en cours. — [30] Castelli, T.: The Bull. Res. Council of Israel **1** (1952). — [31] Verona,

O., et G. Luchetti: Boll. R. Ist. Sup. Agr. Pisa **12** (1936). — [32] Florenzano, G.: Ann. Sper. Agr. **3** (1951). — [33] Malan, C.: Atti Accad. della Vite e del Vino **3** (1951). — [34] Malan, C.: Atti Accad. della Vite e del Vino **5** (1954). — [35] Verona, O.: Boll. Ist. Sup. Agr. Pisa. Nuova Serie **12** (1951). — [36] Niehaus, C. J. G.: Cent. f. Bakt., 2. Abt. **87** (1932). — [37] Castelli, T.: Boll. Sez. Ital. Soc. Int. Microb. **4** (1935). — [38] Verona, O.: Boll. Ist. Sup. Agr. Pisa **9** (1933). — [39] Schanderl, H.: Die Mikrobiologie des Weines. Stuttgart: E. Ulmer 1952. — [40] Bioletti, F. T.: Calif. Agr. Expt. Sta. Bull. **213** (1911). — [41] Cruess, W. V.: Univ. Calif. Pub. Agr. Sci. **4** (1918). — [42] Mrak, E. M., et L. S. McClung: J. Bacter. **40** (1940). — [43] Cantarelli, C.: Recherches en cours. — [44] Castelli, T.: Ann. Microbiol. (Milano) **2** (1941). — [45] Castelli, T.: Ann. Microbiol. (Milano) **2** (1942). — [46] Antoniani, C., et T. Castelli: Ann. Microbiol. (Milano) **2** (1941). — [47] Trotta, A.: Le Industrie Agrarie **23** (1947). — [48] Verona, O.: Il Colt. e Gior. Vinicolo **1** (1952). — [49] Verona, O.: Ann. Inst. Pasteur **82** (1952). — [50] Cantarelli, C.: Riv. di Vit. e di Enol. Conegliano **6** (1953). — [51] Porchet, B.: Ann. Agr. Suisse (1931). — [52] Scardovi, V.: Ann. Microbiol. (Milano) **4** (1951). — [53] Verona, O.: L'Italia Agricola **83**, (1946).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 343—346 (1954).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut in Göttingen.)

Zur Frage nach der Identität von Pedinomonas Korschikov und Chlorochytridion Vischer.

Von

Richard Harder und Wulf Koch.

(Eingegangen am 30. Januar 1954.)

Bekanntlich gibt es unter den *Phycomyceten* zwei große Gruppen, die sich durch die Geißelinsertion voneinander unterscheiden. Bei der einen sind zwei Geißeln am Vorderende, bei der anderen ist nur ein Pulsellum am Hinterende inseriert. Wenn man annimmt, daß die Phycomyceten durch Farbstoffverlust aus Flagellaten oder Algen entstanden seien, bereitet es keinerlei Schwierigkeiten, für die mit zwei Vordergeißeln ausgestatteten Pilze den Anschluß nach unten herzustellen, da solche Typen zahlreich bei Flagellaten-Algen vorkommen. Für Formen mit nur einer Geißel, und zwar einer Schubgeißel, waren hingegen lange keine Vertreter unter den autotrophen Organismen bekannt, und erst 1923 hat Korschikov als erster einen grünen Flagellaten beschrieben, der die Geißel an seinem Hinterende trägt. Korschikov hat ihn *Pedinomonas* genannt und in die neue Ordnung *Protochlorinae* gestellt, die er für verwandt mit den *Volvocales* hält. Unglücklicherweise ist in den Abbildungen Korschikovs aber die Geißel seitlich oder sogar nach oben gezeichnet, so daß man bei unbefangener Betrachtung der Bilder schließen möchte, daß die Geißel sich nicht am Hinter-, sondern am Vorderende befände. In der deutschen Zusammenfassung zu der im übrigen russisch geschriebenen Arbeit heißt es allerdings unzweideutig: „Die einzige, sich nach hinten verdünnende Geißel ist bei der Bewegung nach hinten gerichtet"; trotzdem ist in die Literatur zunächst und vorwiegend nur die gegenteilige Auffassung eingegangen.

So schreibt Pascher (1927): „Geißel eine, am Vorderende etwas seitlich inserierend...", und bei Printz (1927) heißt es: „Geißel am Vorderende inseriert ... über das Vorderende hinweg nach rückwärts gebogen". Erst Smith (1950) gibt in der zweiten Auflage seines Buches der Alge mit einer Geißel „directed backward as a cell swims through the water" eine klare Sonderstellung gegenüber den verwandten Gattungen. In Smiths Abbildung ist auch erstmalig das nicht begeißelte Ende der Zelle nach oben und das begeißelte nach unten gezeichnet. Allerdings ist dabei die Geißel nicht nach hinten vom Körper weggestreckt gezeichnet, sondern bei einer der beiden dargestellten Zellen erstreckt sie sich zwar anfänglich

in der Richtung der Längsachse vom Zellkörper fort nach hinten, biegt dann aber allmählich zum rechten Winkel um, und bei der anderen verläuft sie sogar halbkreisförmig mit der Spitze nach vorne! Die Figuren sind offenbar Umzeichnungen gewisser Korschikovscher Bilder, wobei die Zellen so gedreht worden sind, daß sie der Textdarstellung Korschikovs entsprechen. Die Darstellungen in der Literatur sind also durchaus widersprechend, und auch bei Fritsch (1948) findet man keine Klärung[1].

Wenn so bedeutende Algologen wie Pascher und Printz dem einzigen bis dahin bekannten autotrophen opisthokonten Organismus eindeutig eine Zuggeißel zuschreiben, dann müssen natürlich Zweifel entstehen, ob es denn wohl überhaupt Flagellaten mit Schubgeißel gibt.

Es ist daher sehr wichtig, daß Vischer (1945) einen Flagellaten isoliert hat, dessen einzige, eindeutig am Hinterende der Zelle inserierte Geißel bei der Bewegung ganz ohne Zweifel nach rückwärts gerichtet ist. Vischer war die in einer russischen Zeitschrift erschienene russisch geschriebene Arbeit Korschikovs nicht bekannt; er diskutiert daher gar nicht die Möglichkeit, daß der von ihm gefundene Organismus identisch mit *Pedinomonas* sein könnte, sondern er nennt ihn *Chlorochytridion* aus der Gruppe der *Pulselloflagellatae* oder *Opisthokontae*, zwei Bezeichnungen, die auch neu von ihm geschaffen wurden.

Erst Gams (1947) hat die Korschikovsche Arbeit gewissermaßen wieder ausgegraben und meint, es handle sich auch bei Vischers Organismus um *Pedinomonas*. Vischer weist anschließend (1949) aber darauf hin, daß nach Pascher und Printz die Geißel bei *Pedinomonas* ja am Vorderende inseriert sei, gibt aber zu: „Wenn wir mit Gams annehmen, daß Korschikov sich in bezug auf die Insertion der Geißel und Bewegungsrichtung geirrt hat, so werden wir *Chlorochytridion* mit *Pedinomonas* vereinigen, wobei unsere Art den Namen *Pedinomonas tuberculata* erhält[2].“ Ganz neuerdings (1954) hat Vischer in einem Brief an Professor Fitting aber doch wieder Zweifel geäußert, ob sein *Chlorochytridion* wirklich identisch mit *Pedinomonas* sei, und zwar wieder auf Grund der auf Pascher und Printz zurückgehenden Annahme, *Pedinomonas* habe eine Vordergeißel. Auch Droop, der *Pedinomonas* kürzlich in Finnland gefunden hat (1953), hat ihr noch wieder eine Vordergeißel zugeschrieben.

Die ganze Diskussion würde vielleicht kaum lohnen, wenn den opisthokonten Flagellaten nicht eine so grundsätzlich wichtige Stellung für die

[1] Im Fritschschen Buche kommen weder *Pedinomonas* noch *Chlorochytridion* vor, wohl aber die *Protochlorinae*, die bei den *Cryptomonadales* genannt werden.

[2] Auf Grund dieser Haltung ist im Lehrbuch der Botanik (Fischer/Stuttgart) der Name *Chlorochytridion* der 25. Auflage in der 26. Auflage in *Pedinomonas* abgeändert worden (Harder 1954).

Ableitung der Pilze zukäme, worauf sowohl Vischer (1945, 1949) wie Gams (1947) mit großem Nachdruck hingewiesen haben.

Herr Professor Vischer war so freundlich, uns schon vor Jahren eine Kultur seines *Pedinomonas*-Stammes zu überlassen, so daß wir Gelegenheit hatten, uns selbst ein Bild von diesem interessanten Organismus zu machen[1]. Das veranlaßte uns, uns nicht mit der deutschen Zusammenfassung der Korschikovschen Arbeit zufrieden zu geben, sondern auch den russischen Teil übersetzen zu lassen[2], um Klarheit über Korschikovs Angaben zu erlangen.

Danach kann nun kein Zweifel mehr bestehen, daß Korschikovs Organismus eine Schubgeißel besessen hat. Der Autor war aber offenbar derartig befangen in der damals herrschenden Vorstellung, nach der die Flagellaten ihre Geißeln immer nur am Vorderende tragen, daß er auf keiner seiner 41 Zeichnungen von *Pedinomonas* die Geißel nach hinten eingetragen hat, wohl aber bei einer ganzen Anzahl davon eindeutig nach oben, also nach der üblichen Darstellungsweise „nach vorne". Von der Bewegung sagt er aber, sie erfolge „durch das Geißelchen schwimmend zurück". Er nimmt also an, daß die Zellen ständig nur rückwärts schwämmen! Das heißt ja aber nichts anderes, als daß die Geißel an dem bei der Bewegung das Hinterende darstellenden Teil der Zelle inseriert ist. Auch im russischen Text wird also das gleiche gesagt, was auch in der oben bereits zitierten deutschen Zusammenfassung eindeutig zum Ausdruck kommt. Die irrige Auffassung liegt also nicht bei Korschikov, sondern ist erst durch Pascher und Printz zustande gekommen.

Im übrigen stimmen sämtliche charakteristischen Merkmale des Vischerschen *Chlorochytridion* mit denen von *Pedinomonas* überein:

Die Kleinheit und Abplattung des in der Aufsicht ovalen, nackten Körpers, seine Abrundung unter bestimmten Außenbedingungen, seine sehr schwach ausgeprägte Fähigkeit zu metabolischer Gestaltsveränderung am farblosen Ende, die etwas seitlich verschobene Insertion der Schubgeißel an diesem Zellende, die Lage des muldenförmig wirkenden Chloroplasten auf der Gegenseite zum Geißelpol, das Pyrenoid mit Stärke, die Verdünnung der Geißel am Ende, ihre Länge (1—$1^1/_2$ Körperlängen), ihre Einzahl, ihre starre und gerade Wegstreckung beim plötzlichen Aufhören der Bewegung und ihre eigenartige, bogenförmige Vorwärtskrümmung bis zur schließlichen Berührung der Zelloberfläche bei länger dauernder Ruhelage. In zwei Punkten konnten wir Korschikovs Angaben allerdings nicht bestätigen: Wir haben — ebenso wenig wie Vischer — niemals sexuelle Kopulation beobachtet, was aber einfach daran liegen kann, daß die gesamten Kulturen wohl von einer Zelle abstammen (vgl. Vischer 1949); und weiter haben wir immer gefunden, daß die Zellen unter dem Deckglas sehr rasch unbeweglich werden und auch im hängenden Tropfen sehr bald aufhören, umherzuschwimmen, während Korschikov angibt, daß sie im Hängetropfen lange beweglich blieben. Um die Brauchbarkeit unserer Kammern ein wenig

[1] Über die an den Kulturen gemachten Beobachtungen werden wir gesondert berichten.

[2] Herrn Professor Dr. M. Braun in Göttingen danken wir verbindlichst für die Hilfe seines Seminars für slavische Philologie.

zu überprüfen, haben wir auch *Chlamydomonas* allein oder gemischt mit *Pedinomonas* in sie eingebracht; *Chlamydomonas* war im hängenden Tropfen im Gegensatz zu *Pedinomonas* noch nach Wochen in lebhafter Bewegung. Aber das sind zwei untergeordnete Merkmale gegenüber den zahlreichen vorgenannten, mit Korschikovs Angaben übereinstimmenden; es kann sich dabei auch sehr wohl um Störungen durch die jahrelange künstliche Kultur handeln. Daß die wenig wuchsfreudige *Pedinomonas* sich im Laufe der Zeit verändern kann, hat bereits Vischer festgestellt; sein Stamm bildete anfänglich warzige Ruhestadien, die später weder bei ihm selbst (1949) noch in unseren Kulturen mehr auftraten.

Vischers *Chlorochytridion* ist also, wie schon Gams angenommen hat, identisch mit Korschikovs *Pedinomonas*.

Zusammenfassung.

Es wird dargelegt, daß die Annahme von Gams zu Recht besteht, daß der 1945 von Vischer gefundene opisthokonte, eingeißlige, autotrophe Flagellat *Chlorochytridion* identisch mit der 1923 von Korschikov entdeckten *Pedinomonas* ist.

Literatur.

Droop, M. R.: On the ecology of Flagellates from some brackish and fresh water rockpools of Finland. Acta bot. fenn. **51**, 1 (1953). — Fritsch, F. E.: The structure and reproduction of the algae. Vol. I. Cambridge 1948. — Gams, H.: Die Protochlorinae als autotrophe Vorfahren von Pilzen und Tieren? Mikroskopie (Wien) **2**, 383 (1947). — Harder, R.: Schizophyten, Thallophyten, Bryophyten, Pteridophyten in Lehrb. d. Botanik f. Hochschulen, 26. Aufl. Stuttg. 1954. — Korschikov, A.: Protochlorinae, eine neue Gruppe der grünen Flagellaten. Arch. russ. de protistol. **2**, 148 (1923). — Pascher, A.: Die Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. H. 4. A. Pascher, Volvocales. Jena 1927. — Printz, H.: Chlorophyceae in Engler-Prantl, Die natürlichen Pflanzenfamilien. 2. Aufl. Bd. 3. Leipzig 1927. — Smith, G. M.: The fresh-water Algae of the United States. 2. Edit. New York 1950. — Vischer, W.: Über einen pilzähnlichen autotrophen Mikroorganismus, Chlorochytridion usw. Verh. schweiz. naturforsch. Ges. **56**, 2. Teil, 41 (1945). — Pedinomonas Korschikov und eine neue Flagellatenklasse, Opisthokontae. Verh. intern. Vereinig. f. theoret. u. angew. Limnologie **10**, 504 (1949). — 1954, briefliche Mitteilung.

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 347—357 (1954).

(Dall' Istituto di Patologia Vegetale, Università di Milano.)

The Classification of the Actinomyces Species (= Streptomyces).

By

E. Baldacci, C. Spalla, A. Grein.

(Eingegangen am 1. Februar 1954.)

In the paper by Baldacci, Comaschi, Scotti a. Spalla, read before the Sixth International Congress of Microbiology in Rome in 1953, there was given a provisional key to the identification of the species of *Actinomyces* (= *Streptomyces*). In view of the provisional nature of the above-mentioned paper, we felt that completion by an additional publication was called for. Accordingly, to what we have already written on this subject, we would add the following:

1. The present taxonomical system is based on the classification of the genera, as previously studied (Baldacci 1941). In this classification the genera of the Actinomycetes are laid down in accordance with predominantly micromorphological criteria, such as the presence or absence of "spores", the segmentation and branching of the vegetative mycelium, etc.

2. The numerous species of *Actinomyces* at present known have been grouped together into "series". The reasons underlying this grouping were set out in the previous paper on the subject. As with other groups of Fungi (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* etc.), the "series" is to take an intermediate and botanically undefined place between the genus and the species.

In order to sub-divide these "series", the cultural characteristics[1] observed on a number of substrata (selected in accordance with the criteria specified in paragraph 3) have been used. These cultural characteristics are constituted by the colour — and, where necessary, by the appearance and form — of the colonies before and after sporing, briefly called characteristics of the vegetative and aerial mycelia.

On the other hand, those elements of biological activity, as enzymatic activity, antibiotics, substrate pigments etc., were used as characteristics of the "species".

[1] Approximately 4,000 isolations of Actinomycetes were made, and a certain number of strains utilised for this purpose. We are most grateful to the Farmitalia Co. (Milano) for the help they have given us in these researches.

The following table sums up the characteristics for classification:

Genus	Series	Species
Presence or absence of spores		Enzymatic activity
Arrangement of the spores (single or in series)	Characteristics of the colonies under culture, and colour of the vegetative mycelium and aerial mycelium	Antibiotic activity
Ramification and breaking up of the vegetative mycelium		Soluble pigments spreading through the substratum, in relation to nutrition and p_H.

3. The choice of media — discussed at the end of this paper — used for establishing of the "series" fulfills a particular and well-defined purpose: it enables us to compare our data with those in the literature on the subject. For this reason, we have used those substrata most favoured by students who preceded us in this field. This rubric was adopted by us out of respect for the researches of those who have worked before us, and out of a desire to make the best use of the existing taxonomy. It is to be regretted that this mode of working was not always sufficiently appreciated, and that a certain excess of interest in the biochemical aspect (sometimes erroneously referred to as the physiological aspect) should at times have been allowed to thrust it into the background.

It is clear that standardisation of substrata should be regarded as useful only after an accurate comparison between the descriptions and diagnoses of our predecessors in this field, and the characteristics observed in these new substrata. This too has a place in our research programme.

4. Lastly, we would add a few further points worth consideration: The colour of the aerial mycelium (spore producing) is far more constant than the pigmentation spread through the substratum. In the case of certain series, the colour may be regarded as nearly always the same in the various substrata indicated, so that, if sporing takes place, the colouring is fixed (*albus*, *sulphureus*, *griseus*, *viridis*, *caeruleus*). One may come across a case of sterile mutation (without aerial mycelium), but this would lead to another problem.

It is almost a tradition among mycologists to take into consideration the colour of the vegetative mycelium and of the spores; hence the naming of numerous *Agaricales*, *Ifales* (*Mucedinaceae*, *Dematiaceae* etc.), *Aspergilli* and *Penicillia*, *Fusaria* etc. In the nomenclature of the Actinomycetes, too, ample reference to colour can be found.

In regard to the pigments of the substratum, the colour of the colonies presents the advantage so avoid mixing substances secreted by the Actinomycetes and those of the medium. Moreover, the colour is often but only slightly influenced by the hydrogen ion concentration of the substratum.

In cultures of Actinomycetes, as of Fungi in general, the medium gradually turns the colour of tea or even, at times, a deep red-brown. This pigmentation is normally accompanied by autolytic processes. The dark brown pigmentation is attributable, in the case of moulds, to an accumulation of humin containing N and is characteristic of neutral or alkaline autolysates (as in those Actinomycetes which are appropriately called "chromogenes", Foster, 1949). The compound of colours of the humin is caused by breaking down of cyclic compounds of cell proteins and the condensation and catalytic oxidation of these due to traces of copper present. The maximum humin content is reached with the exhaustion of the sugar in the medium and the formation of NH_3. The addition of tyrosine or tryptophane favours the formation of humin, probably on account of their aromatic groups (Behr, 1930, quoted in Foster, 1949, page 88; Metz, 1930, quoted in Foster, page 88) noted the correlation between autolysis and the dark red-brown pigmentation of the medium; when zinc and iron are present, this pigmentation is more marked.

Various observations regarding Actinomycetes have been made by Lieske (1921), Beijerinck (1900), Afanasiev (1937) and Kriss (1936 till 1939).

Autolysis may be accompanied by the liberation of more cell constituents in soluble form — apart from the other nitrogenous substances, such as amino acids and their polymers (as mentioned above); non-nitrogenous substances, such as simple sugars (free or combined); organic acids; lipid materials, vitamins, coenzymes and minerals. Moreover, change of the hydrogen ion concentration in the medium, favoured by the presence of mineral elements or sugar, also leads to the appearance of different colours (Waksman, 1919; Conn, 1941).

Genetic factors also play their part. The researches of Mitchell and Houlahan (1946, quoted in Foster, page 167) revealed that a red pigmentation appeared in the substratum of a strain of *Neurospora crassa* when a specific enzyme was lost as a result of the destruction of a gene responsible for the synthesis of this enzyme. The strain is not able to synthesise adenine, and the precursor of the adenine is accumulated and converted into a bright purple-red pigment appearing in the substratum and vegetative mycelium. In old cultures it is insoluble, black or red in colour, and is found as granules or in the vacuoles of the mycelium. The mutants of *Neurospora crassa*, which are unable to synthesise nicotinic acid, are another example. These strains, too, are characterised by the appearance of a red-brown substratum. Lastly, metabolic substances,

colourless in themselves, may be formed and excreted by the fungus into the medium where they then react with certain constituents of the medium to produce a coloured compound. One such example is the red colouring brought about by kojic acid when produced in the presence of iron.

All these facts seem clearly to indicate that relying for classification on the colour of the medium may easily lead to false conclusions, unless one has a true knowledge of the pigmentation phenomena. The characteristics of the aerial mycelium and of the vegetative mycelium — by far more constant and more easily standardized — must therefore be taken into account for achieving a system of classification which will ensure the attainment of the end in view: a straightforward routine for the recognition of the species of *Actinomyces*.

For diagnostic purposes, there is, at this stage, scarcely any point in comparing the "series" with the species or linneon as a whole, or the "species" with the variety (jordanon or others). Such considerations are, no doubt, useful but involve the whole problem of the species in microbiology. Our aim is practical classification and therefore empirical and not natural taxonomy.

Schematically, the routine followed may be represented thus:

Vegetative mycelium
- Colourless
  - Aerial mycelium — white
  - Aerial mycelium — coloured
- Coloured
  - Aerial mycelium — white
  - Aerial mycelium — coloured

In some cases observation of these characteristics leads to an immediate recognition of certain very typical species, (such as: *sulphureus*, *albus*, *viridis*, *lavendulae*, *griseus*) or facilitates identification, readily confirmed by diagnosing a few other elements, of other species.

By the colour of the mycelium is meant that which it has during the period between start of growth and the time when it takes on its fixed colouring, that is to say after the first phase of the culture (usually towards the 10th/20th day). What should be regarded as useful elements, however, is the appearance in the aerial mycelium of bunches of hyphae — the structure of which should be studied and defined from a mycological viewpoint — in the form of sporulated "tufts" which are often of colour a quite different from that of the aerial mycelium as a whole (i. e. white or yellow "tufts" with grey aerial mycelium).

In naming the "series" we have taken the name of the species described above, among those which belong to it, accordingly as we have been able to determine. The following table gives a survey of the various "series":

Key to the species of Actinomyces.

Section I: Colourless[1] *Vegetative Mycelium.*

1.	Aerial mycelium — white	Series *ALBUS*
2.	,, ,, sea green	,, *GRISEUS*
3.	,, ,, green-azure . . .	,, *VIRIDIS*
4.	,, ,, azure	,, *CAERULEUS*
5.	,, ,, white/wine/lavender	,, *LAVENDULAE*
6.	,, ,, light pink	,, *ROSEUS*
7.	,, ,, grey	,, *DIASTATICUS*

Section II: Coloured Vegetative Mycelium.

a) Yellow Vegetative Mycelium.

8.	Vegetative mycelium — lemon yellow to custard yellow Aerial mycelium — greyish white	Series *AUREUS*
9.	Vegetative mycelium — reddish yellow-green Aerial mycelium — red/white	,, *MADURAE*
10.	Vegetative mycelium — orange-yellow Aerial mycelium — reddish grey	,, *FRADIAE*
11.	Vegetative mycelium — golden yellow Aerial mycelium — white	,, *ALBIDOFLAVUS*

b) Vegetative Mycelium — brown to black

12.	Aerial mycelium — grey	Series *ANTIBIOTICUS*
13.	,, ,, greyish white	,, *SCABIES*
14.	,, ,, yellow	,, *SULPHUREUS*
15.	,, ,, greenish grey	,, *INTERMEDIUS*

c) Vegetative Mycelium — maroon

16.	Aerial mycelium — grey	Series *RIMOSUS*

d) Vegetative Mycelium — pink

17.	Aerial mycelium — white	Series *BOSTROEMI*

e) Vegetative Mycelium — red

18.	Aerial mycelium — white	Series *ALBOSPOREUS*
19.	,, ,, pink red . . .	,, *RUBRIRAETICULI*
20.	,, ,, black	,, *MELANOSPOREUS*

f) Vegetative Mycelium — bluish violet-red

21.	Aerial mycelium — white with various tints	Series *VIOLACEUS*

[1] The term "colourless" refers to that mycelium which takes on the colour shades of the substratum from which it is developing.

We would point out that this scheme has the advantage of leaving space for new combinations if and when series are established which are, let us suppose, distinctly different from those recorded.

At this stage it is necessary to give an analysis in detail within each series. We shall examine these in alphabetical order.

We have not indicated the name of the author who carried out the study of the species because we feel that it could best be given in further studies of each single series. Only in certain cases, so as to avoid possible confusion due to the ambiguous or double use of the name, have we given the name of the author.

Series *ALBIDOFLAVUS:* This series appears not to have been investigated thorough enough. It includes the species *albidoflavus* and *alboflavus.*

Series *ALBOSPOREUS:* This series too deserves a more thorough investigation. It includes *A. albosporeus* and *A. bobiliae.*

Series *ALBUS:* Baldacci (1939) should be referred to for a study of this series. About 30 synonimous names for this series have been listed by this author.

The following species may be placed under the heading of this last series. These species either bear synonimous names or are related or aggregate species: *albus, acidophilus, almquisti, beddardi, chromogenus, erytreus, exfoliatus, farcinicus, flocculus, gedanensis, gelaticus, gibsonii, gougeroti, heimii, kimbenii, lieskei* Duché, *listerii, malenconi, raeticuli, somaliensis, sanninii* (Ciferri), *saprophyticus* (Gasp.), *thermophilus* (Berestneff) Miehe nec Gilbert, *upcottli, willmorei, Cladothrix dichotoma* Macé, *C. liquefaciens, C. invulnerabilis, C. odorifera, Oospora doriae, O. alpha, Streptothrix alba, S. candida, S. dassonvillei, S. foersteri, S. graminearum, S. leucea, S. latridii, S. pyogenes.*

This is a large series — also in so far as it has the faculty of presenting variations and of adapting itself to various environments and attacking various substrata. There is a considerable body of microbiological and pathological literature on this series.

Series *ANTIBIOTICUS:* Reference should be made to the publications of Waksman (1941). It includes the species *A. antibioticus.*

Series *AUREUS:* A study of this series is of outstanding interest for clarifying such species of traditional text-book interest as *flavus* and *citreus.* We have isolated from soil analogous species in the course of determination. The tendency of the aerial mycelium to vary is manifest and may offer indications for the diagnosis of the relevant species. See Krainsky (1914).

The following species belong to this series: *aureus, aureofaciens, citreus* sensu Krainsky, *fimicarius, flavus, flaveolus, fordii, griseoflavus, hygroscopicus, microflavus, parvus.*

Series *BOSTROEMI:* See Baldacci (1937). This series includes the following species: *bostroemi, carneus, mexicanus, leishmannii.*

Series *CAERULEUS:* See Baldacci (1942). Species: *caeruleus.*

Series *DIASTATICUS:* The species in this series are the following: *diastaticus, cellulosae, griseolus, lipmanii, venezuelae, thermophilus* Gilbert, *diastatochromogenus.*

This series comprises and groups together those which in the previous publication were indicated under "*Neo-in-gri*" and "*In-gri*".

Series *FRADIAE:* See *A. fradiae* [Waksman et C. (1919)].

Series *GRISEUS:* This species has come to the forefront as a result of researches into antibiotics. The species was first described by Krainsky in 1914. An amendment was presented by Waksman in 1919. The following is what Waksman wrote:

"This organism was isolated numerous times from the soil. The term *A. griseus* was used before by Krainsky so that the description of the latter is itself an emendation. Although this organism was originally identified with the organism described by Krainsky under the same name (from description only, without any actual comparison of cultures), this identification should be, therefore, corrected. The culture described here possesses a very strong proteolytic power, while Krainsky stated that his culture was not strong proteolytically."

If we examine the characteristics given by Krainsky we are led to link this species with *A. viridis.* This conclusion appears still more logical when we study the coloured tables prepared by Krainsky. However, in view of the impossibility of comparing Krainsky's original strain and the difficulties that would arise if one did not accept Waksman's amendment for a species so generally studied in laboratories, it appears advisable to take as definite the characteristics specified by the American author and given in Bergey's Manual. It should be noted that the name "*griseus*" is scarcely an apt one for this species, as it is not "grey" but white to bottle-green in colour when sporing. Numerous strains have been isolated by us and compared, with satisfactory results, with Waksman's strains. There is a considerable body of literature dealing with this species which has a faculty for mutation. This series embraces the following species: *griseus, innominatus, odorifera, verne.* See Baldacci and Comachi (1953).

Series *INTERMEDIUS:* This includes the species *intermedius* and *olivaceus.* See the papers by Wollenweber (1920) and Waksman (1919).

Series *LAVENDULAE:* For this series see the papers by Waksman, and Waksman and collaborators (1919 et passim). It includes the species *lavendulae.*

Series *MADURAE:* This was studied by Baldacci (1942) who clarified the reason why it is so named. No relationship between the pathogenic power of the species *madurae* and the aethiology of the disease known as Madura Foot has been established. This species is of very common occurrence in the soil and has a faculty for varying. The series

embraces the following species: *madurae*, *A. bahiensis* (P. de Silva) Brumpt, *californicus*, *micetomae*, *ruber* (Krainsky), *Oospora bahiensis*, *O. micetomae*, *O. madurae*, *Streptotrix madurae*, *S. micetomae*.

Series *MELANOSPOREUS:* See Baldacci (1938). This includes the species *melanosporeus* and *melanocyclus*.

Series *RIMOSUS:* This includes the species *rimosus*. For this series we refer to the papers by Finaly and collaborators (1950). The series corresponds to that which, in the previous publication, is placed under the heading "*Cas-Gri*". We ourselves have made some isolations, but the fact remains that this is a typical case of faulty systematic placing of the Actinomycetes. In fact, a description of *A. rimosus* is not to be found, and the above identification was made possible only by a comparison of cultures. It is obvious that if Latin binomials are used without there being given morphologico-cultural diagnoses, the already complicated classification of the Actinomycetes becomes impossible.

Series *ROSEUS:* This is another "text-book" species and would call for some deeper study — also with reference to repeated descriptions and comments in regard to it. See also Duché (1934). The series embraces the following species: *roseus* Nam., *rosea* C. et C., *roseochromogenes* Jensen.

Series *RUBRIRAETICULI:* For this species, see Krainsky (1914) and Waksman (1919). It embraces *A. rubriraeticuli*.

Series *SCABIES:* This series includes the following species: *scabies* (Thaxter) Waksman, *annulatus*, *caprae* (Silberschmidt), *halstedii*, *olivochromogenus*, *pheochromogenus*, *purpureochromogenes*, *rutgersensis*, *poolensis*. These species were studied by Baldacci a. Spalla (1953) and Spalla a. Boncompagni (1953).

Series *SULPHUREUS:* See Baldacci (1937). This includes the species *sulphureus*. It is well-known that the characteristics of this species have been given as "bovis" since *bovis* has been regarded as an aerobic, spore-producing, species! When it was decided to place *bovis* among the anaerobic species, and therefore asporigenous, "*sulphureus*" was promptly placed among those species imperfectly described or indeterminable!

Series *VIOLACEUS:* Numerous species are gathered together in this series which has a very marked tendency to undergo variation. We refer to the work of Baldacci (1942) for an attempt at re-arrangement of the species (here regarded as varieties) of this series. The series embraces the following species: *violaceus*, *coelicolor*, *novaecaesareae*, *violaceus ruber* W. et C., *violaceus caesari* W. et C., *Oidium variecolor*, *Streptothrix violacea*.

Series *VIRIDIS:* This comprises the following species: *alboviridis*, *flavovirens*, *viridochromogenes*, *viridis* (sensu Lomb. Pell.; Mill. et Burr.; Duchè).

The cultures of Actinomycetes, with a view to their description and identification, were grown on the following media:

1) Potato agar
2) Carrot agar
3) Czapek's modified agar
4) Calcium malate agar
5) Nutrient agar
6) Sugar-Gelatine
7) Meat peptone solution
8) Starch
9) Milk Potato Agar
10) Potato plugs.

The choice of these substrata was made on the basis of our own experience and of the specification set out in the literature on the subject. The following is the composition of the foregoing substrata:

1) *Potato Agar*

Peeled potatoes	g 200
Dextrose	g 20
Agar	g 18
Distilled water	ccm 1000
$p_H = 7.2$	

2) *Carrot Agar*

Carrots	g 350
Agar	g 18
Distilled water	ccm 1000
$p_H = 7.2$	

3) Czapek's *Agar modified*

K_2HPO_4	g 1
$MgSO_4$	g 0.5
KCl	g 0.5
$FeSO_4$	g 0.01
$NaNO_3$	g 2
Sucrose	g 30
Agar	g 18
Distilled water	ccm 1000
$p_H = 7.4$	

4) *Calcium Malate Agar*

Calcium malate	g 10
NH_4Cl	g 0.5
K_2HPO_4	g 0.5
Agar	g 18
Distilled water	ccm 1000
$p_H = 7$	

5) *Nutrient Agar*

Peptone	g 10
Liebigs beaf extract	g 5
NaCl	g 5
Glycerine	g 15
Agar	g 18
Distilled water	ccm 1000
$p_H = 7—7.2$	

6) *Gelatine*

Peptone	g 5
Glucose	g 20
Gelatine	g 200
Distilled water	ccm 1000
$p_H = 7$	

7) *Meat Peptone Solution*

Glucose	g 10
Peptone	g 10
Liebig's beaf extract	g 5
NaCl	g 5
Distilled water	ccm 1000
$p_H = 7—7.2$	

8) *Starch Agar*

Starch gr. 10 in cc. 800 water plus cc. 500 water containing:

K_2HPO_4	g 1
$MgSO_4$	g 1
NaCl	g 1
$(NH_4)_2SO_4$	g 2
$CaCO_3$	g 3
Agar	g 10

9) *Milk Potato Agar*

Sterilised milk poured on to an advanced culture grown on potato agar.

10) *Potato plugs*

in a Roux test tube.

The cultures are checked on the 3rd, 10th, 20th, and 40th day after inoculation. They are first kept in an incubator at 34°—37° for a week

and then at room temperature. The characteristics of the cultures are, from time to time, registered on a specially prepared chart.

The chart is divided into the following headings: colour, appearance and development of the vegetative mycelium; colour of the back surface of the colony (this is clearly visible when the culture is grown on an artificial solid medium); appearance of the colony as a whole (smooth, uneven, raised up, sunken, corrugated, vermiform etc.); colour of aerial mycelium; growth of this last (abundant, below average, average, non-existent etc.); production of pigment.

As regards the biochemical characteristics, cultures on gelatine are made with a view to observing proteolytic activity, and the shape assumed by the fluidified substratum is taken into account (inverted cone, cylindrical, complete, in line with the infission, deep or superficial). Cultures on starch agar are carried out in order to assay the hydrolysis of starch. To observe this characteristic, 3—4 ccm of Lugol's liquid is added [in such a way that the whole substratum surface is submerged (Waksman's method)] 10—15 days after inoculating plates of starch agar, and when the colonies have reached a certain stage of development. Soon afterwards, a zone will appear in which hydrolysis has occurred, and it is the edge of this zone which should be observed (clear-cut or blurred in outline) together with the colour (in order to calculate the dextrine content and sugar content).

The milk was introduced into the tubes containing cultures on potato agar at the end of the observation period. After 10—20 days a curdling and fluidifying activity of the strain is observed, accompanied by coagulation (Gorini's method).

Two methods were adopted for the investigation of morphological characteristics: The first consisted in the microscopic observation of prepared plates of Actinomycete colonies, bringing out in particular the development and appearance of the hyphae. In this way it is possible to determine the presence of hook-like growths, tufts and spores, as these are often clearly seen against the white surface of the starch medium. Observation was focused on the germination of the spores and the initial growth of the colony up to the disappearance of the aerial mycelium, inoculating the strains in Petri dishes containing liquid medium and in which glass slides had been placed in a tilted position. The colonies of Actinomycetes develop first in the broth, and afterwards on the slides. By extracting the glass slide as and when opportune, it is possible to carry out a detailed microscopic study of the shape of these colonies.

Extract.

The paper presents a classification of the *Actinomycetes* completing the provisional one published in the proceedings of the Sixth International Congress of Microbiology (Rome, 1953).

This classification is based on the formation of "series", similar to those of the *Aspergilli, Penicillia, Fusaria* etc. These defined series are defined on the basis of the characteristics of colonies and cultural characteristics, with special reference to the colour of the vegetative mycelium and aerial mycelium.

These characteristics prove more constant than the pigmentation of the substratum (reported to by Waksman in Bergey's Manual).

The paper discusses this last point in full. A list is given of the better known species as grouped together into series. The paper ends with specifications of cultural media and laboratory technique.

Riassunto.

Viene presentata una classificazione degli *Attinomyceti* che completa quella non definitiva pubblicata negli atti del VI. Congresso Internazionale di Microbiologia 1953 (Roma).

La classificazione ha per base la costituzione di „serie" analogamente a quanto è stato fatto per *Aspergilli*, *Penicillia*, *Fusaria* ecc. Per la costituzione delle serie sono stati utilizzati i caratteri delle colonie, i caratteri culturali e particolarmente la colorazione del micelio vegetativo e del micelio aereo.

Questi caratteri si dimostrano più costanti di quelli relativi alla pigmentazione del substrato, utilizzati da Waksman nel Bergey's Manual. La discussione su questo punto viene presentata. Vengono elencate le specie più note da raggruppare nelle singole serie. Infine sono indicati i substrati di cultura e le tecniche di lavoro.

Bibliography.

Afanasiev, M. M.: Res. Bull. **92**, Neb. Agr. Exp. Sta. (1937). — Baldacci, E.: Atti. Ist. Bot. ecc. Pavia. Serie IV. **9**, 299—314 (1937); **10**, 321—329 (1938); **11**, 192—215 (1939); **12**, 99—129 (1941); 3, 139—193 (1942). — Baldacci, E., G. F. Comaschi, T. Scotti e C. Spalla: Symposium Actinomycetales. Suppl. Rendiconti. Ist. Sup. Sanità (Roma) 20—39 (1953). — Baldacci, E., e G. F. Comaschi: Actinomyces griseus (Kr.) Wks. Mycopathologia et Mycologia applicata (is to be printed). — Baldacci, E., e C. Spalla: Actinomyces scabies (Thax.). Wks. Mycopathologia et Mycologia applicata (is to be printed). — Beijerinck, M. W.: Zbl. Bakter. II. **6**, 2—12 (1900). — Duché, J.: Encyclopedie Mycologique Paris VI. (1934). — Finaly, A. C., et All.: Science (Lancaster, Pa.) **85**, 111 (1950). — Foster, J. W.: Chemical activities of Fungi 1949. — Krainsky, A.: Zbl. Bakter. II. **41**, 639—688 (1914). — Kriss, A. E.: Microbiologia **5**, 607—622 (1936). — Kriss, A. E., and A. I. Koriniako: Microbiologia **8**, 514—522 (1939). — Küster, E.: Arch. Mikrobiol. **15**, 1—12 (1950). — Z. Pfl. Düng. Bod. **57**, 42—57 (1952). — Lieske, R.: Morphologie und Biologie der Strahlenpilze. Leipzig: Borntraeger 1921. — Millard, W. A., and S. Burr: Ann. Appl. Biol. **13**, 580—644 (1926). — Spalla, C., e T. Boncompagni: Not. Mal. Piante. N. **23**, (N. S. **2**), 29—41 (1953). — Waksman, S. A.: Science (Lancaster, Pa.) 8, 72—205 (1919). — Waksman, S. A., and H. B. Woodruff: J. Bacter. **42**, 231—249 (1941). — Wollenweber, H. W.: Arb. des Forsch. für Kartoffelbau. Heft **2**, 13 (1920).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 358—361 (1954).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen und dem Institut für Bodenuntersuchung Dr. A. Kawe GmbH, Uslar-Allershausen.)

Untersuchungen über die Beeinflussung des Bakteriengehalts und der Nährstoffe im Boden durch den Riesentrichterling (Clitocybe gigantea Sow.).

Von

Adolf Oppermann und Albert Kawe.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 23. Februar 1954.)

Im Sommer 1950 wurden wir auf einer Waldwiese (Bomhof bei Vahle in der Nähe der Ruine Malliehagen) im Solling auf einen $^1/_2$—1 m breiten Streifen aufmerksam, in dem die Pflanzen braun und abgestorben waren. Er lehnte sich in einem Halbkreis von 20 m Radius an einen nach Süden exponierten Waldrand an. An der Innen- und Außenseite der braunen Zone wuchs das Gras besonders kräftig. In dem geschädigten Gebiet war der Boden in 5—15 cm Tiefe von einem dichten, spinnwebeartigen Mycelgeflecht eines Pilzes durchwuchert. Im Herbst traten hier große Mengen von Fruchtkörpern von *Clitocybe gigantea* Sow. auf.

Hexenringe, eine ringförmige Anordnung von Pilzfruchtkörpern, sind von vielen Pilzen bekannt. Sie können nur bei einer sehr gleichmäßigen Bodenbeschaffenheit und vieljährigem, gleichmäßigem Wachstum des Pilzmycels entstehen. Beides mußte also hier vorgelegen haben. In der Tat erwies sich der Boden, ein tiefgründiger Buntsandstein-Verwitterungsboden mit nur einzelnen, abgerollten Steinen, als sehr homogen. Der Wald bedingte eine gute Feuchtigkeit, die für ein gleichmäßiges Wachstum des Pilzmycels unerläßlich ist. Deutlich war an einer Stelle der Wiese, wo sich ein kleiner, trockener Buckel erhob, eine Einbuchtung des Ringes zu sehen; hier war das Mycel langsamer gewachsen.

Bei den Waldpilzen erreichen die Hexenringe selten mehr als 5—10 m Durchmesser und lassen oft keine Beeinflussung des Pflanzenwuchses erkennen. Eine unmittelbare Beeinflussung des Pflanzenwuchses (von der Mycorrhiza verschiedener Baumarten abgesehen) ist nur von wenigen hexenringbildenden Pilzen bekannt, so z. B. von *Marasmius oreades* (siehe Jahn 1949), gewissen *Collybia*-Arten (Münch 1914) und *Agaricus maximus* (Münch 1914 u. 1917); dem Pilzsammler ist auch bekannt, daß er den Champignon (*Psalliota campestris*) vorwiegend in dem üppiger stehenden Grase kleiner Hexenringe auf Wiesen findet. Nach der von Münch (1917) gegebenen Beschreibung und Abbildung von *Agaricus maximus* scheint dieser Pilz, der auf einer Wiese bei Kaiserslautern einen Hexenring von $35^1/_2$ m Durchmesser bildete, mit der von uns gefundenen *Clitocybe gigantea* identisch zu sein. Gramberg (1939) bezeichnet den von Münch beschriebenen Hexenring als den größten, der bekannt geworden ist. Der Ring wurde später undeutlich, die Stellen der Schädigung des Pflanzenwuchses vereinzelt.

Der von uns aufgefundene Hexenring hatte einen Durchmesser von 40 m, doch ist auch er im Absterben begriffen. Schon im Herbst 1952 bildete er keine Fruchtkörper mehr aus, und die Stellen der Wachstumsschädigung der höheren Pflanzen wurden kleiner und waren nicht mehr zusammenhängend. Dadurch konnten weitere Untersuchungen über die qualitative Veränderung der Bakterienflora, die noch vorgesehen waren, leider nicht mehr durchgeführt werden.

Hollande (1945) hat festgestellt, daß *Clitocybe gigantea* ein Antibioticum, das Clitocybin, bildet, das gegen verschiedene pathogene Mikroorganismen wirksam ist. In unserem Hexenring bot sich eine gute Gelegenheit, den Einfluß des Antibioticums auf die Bakterienflora am natürlichen Standort zu beobachten.

Vielfach zeigen ja Antibiotica, die im Laboratoriumstest große Wirkung haben, eine solche im Boden nicht; sei es, daß die Pilze das Antibioticum auf dem natürlichen Substrat nicht bilden, sei es, daß das Antibioticum im Boden an Humusteilchen adsorbiert und damit unwirksam gemacht wird (Wallhäusser 1951, Literatur auch bei Rippel-Baldes 1952). Andererseits kennt man auch Fälle, wo ein Antibioticum auch in dem natürlichen Substrat gebildet wird und wirksam ist (Grossbard 1948, Oppermann 1951 und andere). Wenn in unserem Falle eine antagonistische Wirkung auch im Boden vorhanden war, so mußte sie sich bei der starken Anhäufung von Mycel feststellen lassen.

Experimenteller Teil.

Zur Untersuchung wurden jeweils 1) $^1/_2$ m vor der Zone des Pilzwachstums, 2) in der Zone des stärksten Pilzwachstums, in der das Gras abgestorben war und 3) $^1/_2$ m hinter dieser Zone, dort, wo das Pflanzenwachstum gefördert war, Bodenproben entnommen. Die Entnahme erfolgte, nachdem von oben eine 2 cm dicke Erdschicht entfernt worden war, mit sterilen Glasröhrchen, die etwa 5 cm in den Boden hineingestoßen wurden. Im Laboratorium wurde die Zahl der Bakterien nach der Kochschen Plattenmethode bestimmt. Probeentnahmen erfolgten am 21. 9., 15. 10. und 7. 11. 1951. Gleichzeitig wurden an den gleichen Stellen die Proben für die unten beschriebenen Nährstoffuntersuchungen entnommen.

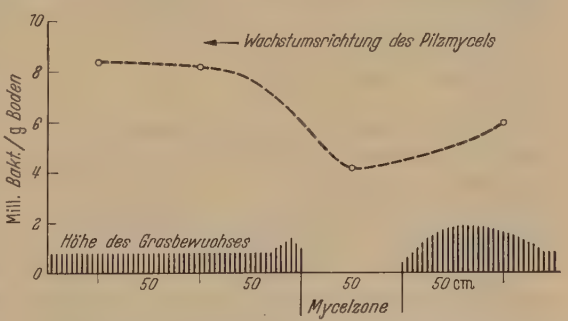


Abb. 1. Bakteriengehalt des Bodens und Höhe des Grases in der Zone des Pilzwachstums und ihrer Umgebung. Links Außenseite, rechts Innenseite des Hexenringes.

Bei der Prüfung auf Bakteriengehalt des Standortbodens ergab sich in allen drei Fällen, daß in der Zone des stärksten Pilzwachstums die Bakterienzahl abnahm (Abb. 1). Außerdem erfolgte hier das Auskeimen der Sporen bei den Sporenbildnern und der Beginn der Teilung bei den

nichtsporenbildenden Bakterien später als bei den außerhalb dieser Zone genommenen Proben. Dies weist auf eine Schädigung selbst dieser noch am Leben gebliebenen Keime hin. Ein Test eines wäßrigen Auszuges aus den Pilzfruchtkörpern ergab eine starke Hemmung des Wachstums der als Testorganismen benutzten Bakterien (*Bac. mycoides, Bac. subtilis, Staphylococcus aureus* und *Bact. coli*). *Bac. mycoides* wurde offensichtlich auch im Erdboden von *Clitocybe* beeinflußt, denn in den Proben aus der verpilzten Zone waren erheblich weniger Individuen dieses Bakteriums vorhanden als in den anderen Proben.

Eine gewisse Beeinflussung der Mikroflora mag auch noch durch die anderen Faktoren gegeben sein, die durch den Pilz verändert wurden. So lag in der Zone des stärksten Pilzwachstums eine leichte Ansäuerung[1] vor (Tab. 1), hervorgerufen wohl durch organische Säuren, die der Pilz während des Wachstums bildet. Die Ansäuerung war zwar gering, doch weist die Veränderung des p_H-Wertes in einem so gut gepufferten Medium, wie es der Erdboden ist, darauf hin, daß der Pilz auch unter natürlichen Bedingungen erhebliche Säuremengen bildet.

Tabelle 1. p_H-*Werte, Kalium-Gehalt, Phosphor-Gehalt und wasserhaltende Kraft des Bodens in der Pilzwachstumszone und ihrer Umgebung*.*

	Zone vor dem Pilzmycel	Zone des stärksten Pilzwachstums	Zone der Förderung des Graswachstums
p_H-Wert	5,9	5,4	5,6
K_2O-Wert**	0,6	2,4	0,6
P_2O_5-Wert***	7,7	1,9	1,9
Wasserhaltende Kraft in %.	72	52	62

* Die Werte sind Mittelwerte aus den 3 zu verschiedenen Zeiten genommenen Proben.

** mg K_2O in 100 g lufttrockenen Bodens.

*** Konzentration P_2O_5 im Filtrat der Ausschüttelung des Bodens mit seiner eigenen Bodenlösung, Konzentration 1 = 0,142 mg P_2O_5/l.

Sehr auffällig war weiterhin die Veränderung des Gehalts dieser Zone an Kalium und Phosphat (Tab. 1)[2]. In der Zone des stärksten Pilzwachstums wurde bei allen Untersuchungen ein erheblich erhöhter Gehalt an leicht löslichem Kalium gefunden, und zwar die 3—4fache Menge des in den anderen Proben festgestellten. Der Gehalt an Phosphat dagegen nahm innerhalb der Zone starken Pilzwachstums erheblich ab (Tab. 1).

Das ist verständlich, wenn man bedenkt, daß zur Bildung eines so reichlichen Mycels größere Phosphatmengen verbraucht werden. Auch dort, wo das Pilzmycel schon abgestorben war und das Wachstum der höheren Pflanzen wieder einsetzte,

[1] Gemessen nach der Methode Kawe (1935) in der Aufschlämmung des Bodens mit seiner eigenen Bodenlösung.

[2] Der K-Gehalt wurde nach der Methode Kawe (1935) flammenphotometrisch, der P_2O_5-Gehalt nach derselben Methode kolorimetrisch bestimmt.

war der Phosphatgehalt noch niedrig; der im Pilzmycel gebundene Phosphor wird anscheinend nur sehr langsam wieder freigesetzt.

Das Ansteigen des Kaliumgehalts in der Zone ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß das Wachstum der höheren Pflanzen, die ja viel Kalium verbrauchen, völlig verhindert wird, die vorhandenen Pflanzenwurzeln abgestorben sind und die Löslichkeit des vorhandenen Kaliums durch die leichte Ansäuerung des Bodens noch begünstigt wird.

Auf einen Faktor sei noch hingewiesen, den das Pilzmycel stark beeinflußte: die wasserhaltende Kraft des Bodens. Sie ist ein Maß für die Gare des Bodens. In den Gebieten, in denen das Pilzmycel den Boden durchwucherte, sank sie erheblich ab (Tab. 1).

Die Untersuchungen haben also gezeigt, daß ein Pilz an seinem natürlichen Standort einen großen Einfluß sowohl auf die Mikroflora des Bodens als auch auf die Vegetation höherer Pflanzen ausüben kann und außerdem noch verschiedene andere Faktoren im Boden stark beeinflußt.

Zusammenfassung.

Untersuchungen an einem Hexenring von *Clitocybe gigantea* Sow. ergaben:

Die höheren Pflanzen wurden in der Zone starken Pilzwachstums abgetötet.

Die Zahl der Bakterien in der Bodenmikroflora nahm unter der Wirkung des Pilzes ab.

In der Zone starken Pilzwachstums fand im Boden eine leichte Ansäuerung statt. Der K_2O-Wert stieg in dieser Zone auf das 4fache. Der P_2O_5-Wert war in der Pilzwachstumszone hingegen sehr stark erniedrigt. Die wasserhaltende Kraft des Bodens wurde durch den Pilz erheblich gesenkt (von 72 auf 52%).

Literatur.

Gramberg, E.: Pilze der Heimat. Leipzig: Quelle & Meyer 1939. — Grossbard, E.: Nature (Lond.) **161**, 614 (1948). — Hollande, A. C.: Comptes rendus **221**, 361 (1945). — Jahn, H.: Pilze rundum. Hamburg: Park-Verlag 1949. — Kawe, A.: Z. Pflanzenernährg. **43**, 69 (1936). — Münch, E.: Naturwiss. Z. Forst- u. Landw. **12**, 133 (1914); **15**, 373 (1917). — Oppermann, A.: Arch. Mikrobiol. **16**, 364 (1951). — Rippel-Baldes, A.: Grundriß der Mikrobiologie. Berlin und Göttingen 1952. — Wallhäusser, K. H.: Arch. Mikrobiol. **16**, 237 (1951).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 362—390 (1954).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie, Mahlum über Derneburg.)

Untersuchungen zur Erdölbakteriologie.

II. Über Vorkommen und Verhalten von Mikroorganismen in Erdöl.

Von

D. Knösel und W. Schwartz.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. März 1954.)

An der weiten Verbreitung lebender Mikroorganismen in Erdöl kann heute nicht mehr gezweifelt werden, nachdem die ersten Feststellungen amerikanischer und russischer Forscher immer wieder bestätigt worden sind. Einen Überblick über den gegenwärtigen Stand der Mikrobiologie des Erdöls findet man z. B. bei Schwartz u. Müller (1948, 1953) und bei Appert (1952).

Dagegen ist über die Faktoren, von denen im Erdöl die Entwicklung von Mikroorganismen abhängt, nur sehr wenig bekannt. Einzelne, von anderer Seite nicht bestätigte Hinweise, z. B. über Beziehungen zum Alter der Lagerstätte, findet man in der schwer zugänglichen russischen Literatur (Ginsburg-Karagitschewa, 1926). Wichtig wäre vor allem die Kenntnis der Ernährungs- und Stoffwechselverhältnisse im Erdöl; einmal wegen der wiederholt geäußerten Vermutung über einen Zusammenhang der heute im Erdöl lebenden Mikroorganismen mit den an seiner Entstehung beteiligten Mikroorganismen, dann aber auch mit Rücksicht auf die Frage, ob es gelingen wird, mikrobiell bedingte chemische Prozesse, mit deren Vorhandensein im Erdöl gerechnet werden muß, aufzuklären und sie experimentell zu beeinflussen. Die Voraussetzung hierfür ist, daß zunächst genauere Grundlagen über die allgemeinen Lebensbedingungen im Erdöl ermittelt werden, als sie bisher bekannt geworden sind. Auch Untersuchungen bei höheren Temperaturen und erhöhtem Druck haben zu Vergleichszwecken eine Klärung der Lebensverhältnisse im mittleren Temperaturbereich und bei dem an der Erdoberfläche herrschenden Druck zur Voraussetzung.

Der Deutschen Gesellschaft für Mineralölwissenschaft und Kohlechemie danken wir für die gewährte Unterstützung, desgleichen den Erdölgesellschaften „DEA", „Gewerkschaft Elwerath" und „Wintershall AG." für ihre Hilfsbereitschaft und für das verständnisvolle Eingehen auf unsere Wünsche.

I. Methodik.

1. Herkunft der Ölproben.

Die Untersuchungen erstreckten sich auf 9 Ölproben, davon 6 von den Ölfeldern in Nienhagen, Hannover, und 3 vom Ölfeld Melldorf, Holstein (Tab. 1). Für die Auswahl der Ölproben erschien es einmal von Wichtigkeit, Öle verschiedener Herkunft und Beschaffenheit zu vergleichen; zum anderen festzustellen, inwieweit bei Ölen aus der gleichen Lagerstätte, also bei im allgemeinen gleicher geologischer Herkunft und zum mindesten ähnlicher chemischer und physikalischer Beschaffenheit, Übereinstimmungen im Vorhandensein und den Lebensbedingungen von Mikroorganismen bestanden. Die Ölproben wurden an der Erdoberfläche unter sterilen Bedingungen an der fließenden Sonde in sterilen Glasstopfenflaschen von 500 cm^3 Inhalt aufgefangen und im Laboratorium dunkel bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Tabelle 1. *Geologische und chemische Daten über die untersuchten Erdöle.*

Bezeichnung	Feld und Sonde	geol. Formation und Teufe	Wassergehalt	Bemerkungen	Datum der Probenahme
M 86	Melldorf 86	Zechstein 1393—1415 m	Spuren	sehr gasreich	27. 8. 1951
M 115	Melldorf 115	Zechstein 999 m	Spuren	sehr gasreich	27. 8. 1951 19. 9. 1952
M 42	Melldorf 42	Zechstein 947—962 m	0,3%	Asphaltgehalt 7%	27. 8. 1951
E 4/15	Eicklingen[1] 4, 6, 10, 12, 15	Valendis 500—800 m	0,9%	dünnflüssig	8. 6. 1951
E 114	Eicklingen 114	Valendis			6. 9. 1952
K 6	Kulenberg 6	Wealden 1160—1190 m	frei	eruptiv	14. 5. 1952
K 2	Kulenberg 2	Wealden 1200 m	Spuren	eruptiv	14. 5. 1952
F 33	Fröhlich 33	Wealden 1427—1442 m	8,5%	Paraffingehalt 3,4—3,6%	6. 9. 1952
S 7	Schmal 7	Wealden	20%		14. 5. 1952

[1] Sammelprobe.

2. Mikroskopische Untersuchung.

Eine direkte mikroskopische Untersuchung von Ölproben in Ausstrichen und Deckglaspräparaten hat nur bei verhältnismäßig hohen Keim- und Wassergehalten Erfolg, wenn sich Mikroorganismen in den im Öl eingeschlossenen Tröpfchen von Ölwasser nachweisen lassen. Bei unseren Untersuchungen trafen diese Voraussetzungen nicht zu.

3. Bestimmung des Keimgehaltes.

Wir waren daher auf die indirekte Methode des Nachweises durch Kulturversuche angewiesen. Als Nährmedien kamen zunächst Fleischbouillonagar (FbAg), Fleischbouillon (Fb) und Würzeagar (WAg) der üblichen Zusammensetzung in Frage, die nach den ersten orientierenden Versuchen durch Medien von geringerem Nährstoffgehalt ersetzt wurden. Als Zusatz zum Erdöl diente unter anderem eine

C-freie Nährlösung[1], die von Bushnell u. Haas (1941) zur Kultur kohlenwasserstoffabbauender Organismen benutzt worden ist. Die Kulturen wurden im allgemeinen bei einer Temperatur von 30° C im Brutschrank aufbewahrt[2].

a) Aerobier.

Wir benutzten das Plattenverfahren nach Koch und das Zehntelungsverfahren nach Schütz (1915). Das Zehntelungsverfahren, dessen variationsstatistische Auswertung durch Krombholz u. Lorenz (1927, 1939) erfolgt ist, bietet gegenüber dem Plattenverfahren den Vorteil der Verwendbarkeit sowohl bei niedrigen wie bei hohen Keimgehalten. Der Verwendbarkeit des Plattenverfahrens bei niedrigen Keimgehalten war dagegen eine Grenze gesetzt, weil der Nährboden bei Einsaaten von mehr als $^1/_{10}$ cm³ Öl undurchsichtig wird. In den zulässigen Bereichen ermöglicht hingegen das Plattenverfahren die Bestimmung des Keimgehaltes mit relativ geringem Materialverbrauch, während der Verbrauch beim Zehntelungsverfahren recht hoch ist.

Plattenverfahren: Eine gleichmäßige Verteilung des Öles in den Verdünnungsstufen und in den Medien läßt sich durch Zugabe eines Emulgators zum Wasser der Schüttelflaschen (500 cm³ Rollflaschen mit Gummistopfen) erreichen. Wie bei früheren Untersuchungen (Müller u. Schwartz 1948) benutzten wir Agar, bei leichtflüssigen Ölen 0,2%, bei zähflüssigen 0,3%. In den meisten Fällen ist bereits nach 5 min langem Schütteln das Öl gleichmäßig in Gestalt feinster Tröpfchen im Wasser verteilt. Bei sorgfältigem Arbeiten lassen sich auch bei Erdöl als Keimträger die Fehler in den üblichen Grenzen halten. Lediglich bei besonders schwierigen, in der Beschaffenheit des Öls liegenden Voraussetzungen (hohe Viscosität), muß mit größeren Fehlern gerechnet werden.

Zehntelungsverfahren: Wir haben zunächst eine Öl/Wasser-Emulsion bestimmter Zusammensetzung mit 0,2—0,3% Agar hergestellt. Das emulgierte Öl läßt sich alsdann in Fb oder einem anderen flüssigen Medium ohne störende Schaumbildung genügend fein verteilen und verdünnen. Bei kleinen Ölmengen ist die Emulsion beständig, größere Ölmengen setzen sich nach einiger Zeit an der Oberfläche der Nährlösung ab. Ölmengen bis zu 10^{-2} cm³ aufwärts wurden in Reagensröhrchen mit 6 cm³ Nährlösung angesetzt. Größere Ölmengen verlangten größere Mengen an Nährlösung, da bei einem zu geringen Anteil an Nährlösung eine Entwicklung in der Regel ausblieb. Für Ölmengen bis zu 10^{-1} cm³ benutzten wir Erlenmeyer-Kolben mit 25 cm³ Nährlösung, für Ölmengen bis zu 1 cm³ Kolben mit 100 cm³ Nährlösung.

Beispiel: Bestimmung des Keimgehaltes im Öl F 33.

Zehntelungsstufen: I je 1 cm³ Öl
II je 1/10 cm³ Öl
III je 1/100 cm³ Öl
} in je 9 Reagensgläsern bzw. Erlenmeyer-Kolben mit Nährlösung

Die Auszählung nach 10^d ergab:

Zehntelungsstufe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Wachstum in
I. (1/1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9 Gefäßen
II. (1/10)	+	—	—	+	—	+	+	—	+	5 Gefäßen
III. (1/100)	—	—	+	—	—	+	—	—	—	2 Gefäßen

[1] Nährlösung nach Bushnell u. Haas (BH); Zusammensetzung: aqu. dest. 1000 cm³; $MgSO_4$ 0,2 g; $CaCl_2$ 0,02 g; KH_2PO_4 1,0 g; K_2HPO_4 1,0 g; NH_4NO_3 1,0 g; $FeCl_3$ 2 Tropfen einer konzentrierten Lösung.

[2] Weitere im Text benutzte Abkürzungen: FbG: Fleischbouillongelatine; Ltw: Leitungswasser; Sw: Seewasser; AKG: Anfangskeimgehalt.

Für die Auswertung ist die erste Verdünnungsstufe maßgebend, deren Glieder nicht sämtlich eine Entwicklung von Mikroorganismen zeigen (Stufe II). Von der folgenden Verdünnungsreihe (Stufe III) werden jeweils zwei positive Glieder als ein positives Glied zur Zahl der positiven Glieder in der maßgebenden Reihe hinzugerechnet. In diesem Falle ergeben sich also 5 + 1 = 6 positive Glieder.

Danach beträgt entsprechend der Auswertungstabelle von Krombholz u. Lorenz die wahrscheinliche Keimzahl 8 Keime in 1/10 cm^3 Öl (nicht weniger als 6; nicht mehr als 15). Für 1 cm^3 Öl ergibt sich eine Keimzahl von 8×10^1.

b) Anaerobier.

Der Nachweis der Anaerobier erfolgte durch Kultur in hoher Schicht im Burri-Röhrchen, ferner mit dem Platten- und Zehntelungsverfahren, wobei für die Herstellung reduktiver Bedingungen in den verwendeten Medien durch Zugabe von Ascorbinsäure-Präparaten[1] in einer Konzentration von 0,1% gesorgt wurde. Flüssige Medien wurden außerdem durch Überschichten mit sterilem Paraffinöl, feste Medien in Röhrchen durch Plomben von sterilem, reduziertem Methylenblau-Ltw-Agar geschützt. Die Petri-Schalen standen während der Bebrütung in Exsiccatoren oder Zeissler-Gefäßen in einer sauerstofffreien Stickstoff/Kohlendioxyd-Atmosphäre (Mischungsverhältnis etwa 29 : 1). Die Nährmedien für diese Versuche wurden vor dem Sterilisieren mit KOH auf etwa $p_H = 8{,}5$ eingestellt. Nach Zugabe der getrennt sterilisierten Ascorbinsäure-Präparate lagen die p_H-Werte etwa bei 7,2 bzw. wurden mit steriler 1%iger KOH auf diesen Wert eingestellt. Zum Verfahren nach Burri benutzten wir beiderseits offene Glasröhren von etwa 18 mm ⌀ und 25—30 cm Länge, die, verschlossen mit Wattestopfen, trocken sterilisiert worden waren. Danach wurden die Wattestopfen durch sterile Korkstopfen ausgetauscht, die nach Füllung der Röhrchen mit etwa 25—30 cm^3 keimhaltigem Nährboden und beiderseits angebrachten Plomben aus Methylenblau-Ltw-Agar einen Paraffinüberzug erhielten. Eine angenäherte Auszählung der heranwachsenden Kolonien gelingt vor einer starken elektrischen Lampe. Kolonien, die sich in den Röhrchen entwickelt hatten, ließen sich nach Abschluß des Versuches mit der Agarsäule herausdrücken, durch Zerlegung der Agarsäule in einer sterilen Petri-Schale isolieren und durch wiederholte Subkultur reinigen.

4. Nachweis spezifischer Keime.

Erdöl gehört zu den Standorten, die ähnlich wie Erde und Schlamm von einem Gemisch verschiedenartiger Mikroorganismen bewohnt werden. Auch bei seiner Untersuchung besteht nach den allerdings noch nicht nachgeprüften Ergebnissen von Exserzew (1952) eine erhebliche Diskrepanz zwischen den durch Ausschlämmen und direkte Zählung und den durch Kultur ermittelten Keimzahlen. Da es offenbar kein Medium zum Nachweis sämtlicher vorhandenen Keime gibt, haben wir die allgemeinen Keimgehaltsbestimmungen durch Anwendung einiger Spezial-Nährböden ergänzt. Zum Nachweis desulfurizierender Bakterien diente die Nährlösung nach Starkey (1938) mit verschiedenen H-Donatoren bei Temperaturen von 30 und 55° C, zum Nachweis von Denitrifizierern die Nährlösung nach Janke (1946), von Methanbildnern das Medium von Barker (1936). Der Nachweis von Cellulosespaltern erfolgte aerob in der Nährlösung nach Waksman u. Carey (1926), anaerob nach Omeliansky (1902). Ferner wurden Leberbouillon und Hirnbrei verwandt. Die Einsaatmengen lagen zwischen 5 und 10 cm^3 Öl in 20—80 cm^3 Nährlösung.

5. Sauerstoff.

Zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung wurden bei einem Teil der Versuche die Kulturen durch einen Vibrator gelüftet. Die Luft wurde durch ein Glasrohr

[1] „Vicelat", Farbenwerke Bayer, Leverkusen; „Cebion", E. Merck, Darmstadt.

zugeleitet, das mit seinem capillar ausgezogenen Ende fast bis auf den Boden des als Kulturgefäß dienenden Erlenmeyer-Kolbens reichte. Für die Keimfreiheit der zugeleiteten Luft sorgten zwischen Vibrator und Glasrohr eingeschaltete Wattefilter, deren Zuverlässigkeit durch Einleiten des Luftstromes während 12 Std. in verdünnte Fb und nachfolgende Bebrütung geprüft worden war.

6. Bestimmung von p_H *und* r_H *in Öl/Wasser-Emulsionen.*

Der wäßrige Anteil von Rohöl/Wasser-Emulsionen mit 5—20 Vol% Wasser wurde vorsichtig abpipettiert oder im Scheidetrichter abgetrennt. Die Bestimmungen erfolgten colorimetrisch, indem das abgetrennte Wasser auf Indicatorpapier aufgebracht oder mit Universal-Indicator[1] versetzt wurde. Bei r_H Bestimmungen wurde das Wasser sofort in Proberöhrchen mit Paraffinöl überschichtet und mit Lösungen der Indicatorfarbstoffe[2] versetzt. Auf diese Weise ließ sich wenigstens eine angenäherte Bestimmung der Redox-Verhältnisse ermöglichen.

7. Identifizierung der isolierten Mikroorganismen.

Da Pilze in unseren Versuchen nur ganz vereinzelt und unregelmäßig auftraten und nicht mit Sicherheit als aus dem Öl stammend nachgewiesen werden konnten, haben wir uns auf *Bakterien* und *Actinomyceten* beschränkt. Die auf festen Nährböden isolierten Stämme wurden zunächst durch wiederholte Plattenkultur sorgfältig gereinigt, bis auf den Petri-Schalen nur noch Kolonien einheitlicher Beschaffenheit wuchsen. Die Bearbeitung der Reinkulturen erfolgte unter Verwendung der Tabellen von Skerman (1949) nach „Bergeys Manual of Determinative Bacteriology" (1948). Nur ein Stamm ließ sich identifizieren. Alle übrigen wurden vorerst nicht benannt, sondern unter Verwendung besonderer von Schwartz u. Müller entwickelter Kennkarten beschrieben[3].

II. Experimenteller Teil.

1. Verwendbarkeit verschiedener Nährmedien zum Nachweis von Keimen in Erdöl.

Erdöl und erdölspeichernde Sedimentgesteine lassen als Standort von Mikroorganismen eine weitgehende Anpassung und Spezialisierung an die eigenartigen Lebensbedingungen erwarten. Es war keineswegs sicher, daß hochwertige Nährböden der üblichen Zusammensetzung die höchsten Keimzahlen ergeben würden. Allerdings hatte sich in früheren Untersuchungen unverdünnte Fb gegenüber synthetischen Medien als überlegen erwiesen (Müller u. Schwartz, 1948). Auch wir haben mit Bodenextrakt enthaltenden Substraten, Haferdekokt und einigen synthetischen Medien keine guten Ergebnisse erzielt. In mit Wasser oder Wasseragar verdünnten Fb-Medien lagen dagegen die Keimzahlen fast immer um größere oder kleinere Beträge höher als im unverdünnten

[1] Indicatorpapiere Bayer und Merck; Universalindicator Merck.

[2] Farbstoffe von E. Merck, Darmstadt. — Wir sind uns der Problematik der r_H-Werte und ihrer colorimetrischen Erfassung bewußt. Da ein näheres Eingehen auf die Redox-Verhältnisse im Öl nicht im Rahmen dieser Arbeit lag, haben wir uns mit den in Serienversuchen einfach durchzuführenden und an keine apparativen Voraussetzungen gebundenen colorimetrischen Bestimmungen begnügt.

[3] Noch nicht veröffentlicht.

Medium. In einigen Fällen trat in unverdünnter Fb kein Wachstum ein, während sich in 1:5 verdünnter Fb mehrere Bakterienstämme entwickelten. Auch zeigten sich qualitative Unterschiede; so wuchsen z. B. in Fb 1:5 und 1:10 4 verschiedene Stämme, in unverdünnter oder 1:1 verdünnter Fb nur 2 (Tab. 2). Wir sind daher bei den folgenden Untersuchungen von einer 1:5 verdünnten Fb ausgegangen und haben synthetische Medien nur in besonderen Fällen herangezogen.

Tabelle 2.

Keimgehalte bei Verwendung von Fb-Medien mit verschiedenen Nährstoffgehalten
(Ziffern in eckigen Klammern: Anzahl der gewachsenen verschiedenen Bakterienstämme, Maximalwerte unterstrichen; Erklärung der Abkürzungen S. 363 u. 364; es bedeuten 0 negativ, — nicht geprüft.)

Ölprobe	Substrat und Keimgehalt je cm³ Öl			
	Fb	Fb/Ltw 1:1	Fb/Ltw 1:5	Fb/Ltw 1:10
M 86	$8{,}1\times10^{1}$ [2]	$1{,}5\times10^{2}$ [2]	$\underline{2{,}2\times10^{2}}$ [4]	$\underline{2{,}2\times10^{2}}$ [4]
K 2	0	—	$\underline{8\times10^{2}}$ [2]	—
	FbAg	FbAg/LtwAg 1:1	FbAg/LtwAg 1:5	FbAg/LtwAg 1:10
M115 (Z1,1)*	$2{,}0\times10^{4}$	$1{,}8\times10^{4}$	$\underline{2{,}2\times10^{4}}$	$1{,}6\times10^{4}$
M115 (Z1,5)	$3{,}1\times10^{6}$	$3{,}2\times10^{6}$	$\underline{3{,}9\times10^{6}}$	$3{,}2\times10^{6}$
M115 (Z1,7)	$2{,}6\times10^{7}$	$2{,}6\times10^{7}$	$\underline{3{,}1\times10^{7}}$	$2{,}4\times10^{7}$
M115 (Z1,11)	$1{,}5\times10^{6}$	$\underline{1{,}6\times10^{6}}$	$\underline{1{,}6\times10^{6}}$	$1{,}2\times10^{6}$

* Die Bezeichnung der einzelnen Versuchsreihen ist in Klammern beigefügt.

Da für Erdöl auf Grund unserer heutigen Erkenntnisse eine Entstehung in marinem Sapropel angenommen wird, da fernerhin das die Öllagerstätten begleitende Wasser stets Salzwasser ist, mußte damit gerechnet werden, daß auch Gegenwart oder Fehlen größerer Salzmengen im Nährsubstrat, abgesehen von 0,5% NaCl in unverdünnter Fb, von Einfluß sein würde. Bei Zugabe von Seewasser zum Medium, wie auch bei der Verwendung des von ZoBELL (1946a) bei der Kultur mariner Bakterien verwendeten Agars 2216[1], war eine eindeutige Bevorzugung der Medien mit erhöhtem Salzgehalt nicht zu erkennen (Tab. 3). Auch in qualitativer Hinsicht schienen keine Unterschiede zu bestehen.

Was schließlich die Frage der Anaerobiose anbetrifft, so waren die Unterschiede gegenüber der Kultur unter aeroben Bedingungen wesentlich geringer, als wir erwartet hatten (Tab. 4). Vergleichende Untersuchungen haben wir vor allem mit den Melldorfer Ölen ausgeführt. Nur

[1] Zusammensetzung: Sw 1000 cm³; Pepton 5 g; Ferriphosphat 0,1 g; Agar 15 g.

Tabelle 3. *Keimgehalte in Medien mit Zusatz von Seesalz*.*

Ölprobe	Keimgehalt je cm³ Öl					
	Fb/Ltw 1:5	Fb/Ltw/Sw 1:2,5:2,5	Fb/Sw 1:5	FbAg/LtwAg 1:5	2216/LtwAg 1:1	2216**
F33	$1{,}5\times10^3$	$8{,}0\times10^2$	$6{,}0\times10^2$	—	—	—
M86 (Z3,1)	—	—	—	$4{,}9\times10^5$	$5{,}1\times10^5$	$5{,}1\times10^5$
M86 (Z3,2)	—	—	—	$9{,}0\times10^4$	$9{,}0\times10^4$	$8{,}2\times10^4$
M86 (Z3,3)	—	—	—	$6{,}2\times10^5$	$5{,}5\times10^5$	$5{,}7\times10^5$
M86 (Z3,4)	—	—	—	$8{,}7\times10^5$	$9{,}0\times10^5$	$7{,}0\times10^5$

* Wir benutzten das Seesalzpräparat „Sicca" für Meerwasseraquarien der Firma Dobelmann, Stuttgart.

** Erklärung im Text (S. 367).

Keime aus diesen Ölen und dem Öl E4/15 entwickelten sich ohne Schwierigkeiten auf festen Nährböden. Die Vermutung, daß ein großer Teil der Kolonien zu fakultativ aeroben oder anaeroben Stämmen gehört, konnte zunächst durch das Auftreten gleicher Kolonieformen, später durch eingehendere Untersuchung der in Reinkultur isolierten Stämme bestätigt werden. Nur wenige Keime erwiesen sich als obligat aerob oder anaerob, wobei sich herausstellte, daß sich die obligaten Anaerobier nur in flüssigen Medien entwickelt hatten.

Tabelle 4. *Keimgehalte bei aerober und anaerober Kultur.*

Ölprobe	Keimgehalt je cm³ Öl				
	Plattenkult. aerob	Plattenkult. anaerob	Hohe Schicht*	Zehntelungsverf. aerob	Zehntelungsverf. anaerob
M86	$8{,}6\times10^2$	$1{,}0\times10^3$	$1{,}0\times10^3$	$1{,}1\times10^3$	—
M42	$9{,}0\times10^1$	$6{,}0\times10^1$	0	—	—
M115	$3{,}6\times10^2$	$5{,}0\times10^2$	$4{,}0\times10^2$	$3{,}5\times10^2$	—
M115 (Z1,2)	$3{,}8\times10^4$	$3{,}2\times10^4$	$3{,}0\times10^4$	$8{,}0\times10^4$	$8{,}0\times10^4$
M115 (Z1,2)	$4{,}4\times10^4$	$4{,}2\times10^4$	$4{,}0\times10^4$	$8{,}0\times10^4$	$1{,}1\times10^5$
M115 (Z1,5)	0	0	0	$1{,}1\times10^6$	$8{,}0\times10^5$
M115 (Z1,6)	$2{,}2\times10^4$	$1{,}6\times10^4$	$2{,}0\times10^4$	$5{,}0\times10^5$	$2{,}0\times10^5$
F33 (Z1,1	0	—	—	$8{,}0\times10^4$	$1{,}1\times10^5$
F33 (Z1,2)	0	—	—	$2{,}2\times10^3$	$1{,}5\times10^3$
F33 (Z1,3)	0	—	—	$6{,}0\times10^4$	$8{,}0\times10^4$
K6 (Z2,1)	0	—	—	$1{,}1\times10^5$	$8{,}0\times10^4$
K6 (Z2,3)	0	—	—	$1{,}1\times10^3$	$5{,}0\times10^2$

* Angenäherte Bestimmung (vgl. S. 365).

In Ascorbinsäure enthaltendem Agar wuchsen die Kolonien im allgemeinen langsamer und blieben kleiner. In einzelnen Fällen trat mit Ascorbinsäure Gasbildung auf, die bei Anaerobiose ohne Ascorbinsäure fehlte.

Abgesehen von der Anaerobiose hat sich bei den Melldorfer Ölen, bei denen der Keimgehalt durch direkte Aussaat mit festen und flüssigen Medien bestimmt werden konnte, gezeigt, daß die Keimzahlen in flüssigen Medien in der Regel höher sind.

2. Höhe der Keimgehalte und Artzugehörigkeit der isolierten Mikroorganismen.

a) Höhe der Keimgehalte.

Keines der untersuchten Öle war steril. Die Höhe der Keimgehalte war allerdings in den frisch aus der Sonde entnommenen Rohölen recht verschieden. Sie schwankte z. B. in einer Versuchsserie zwischen 1×10^0 und $1{,}5 \times 10^3$ Keimen je Kubikzentimeter (Tab. 5) und erreichte nur

Tabelle 5. *Keimgehalt verschiedener Ölproben.*

Ölprobe	Keimgehalt je cm³ Öl				
	Wassergehalt	Plattenverf.	Zehntelungsverf.	Trübung in Leberbouillon	Verhalten in Spezialmedien
M86	Spuren	$9{,}6 \times 10^2$	$1{,}1 \times 10^3$	+	*Desulfurikanten Denitrifikanten Cellulosevergärer anaerob.*
M115(1)	Spuren	$3{,}6 \times 10^2$	$3{,}4 \times 10^2$	+	*Denitrifikanten*
M115(2)	Spuren	$2{,}2 \times 10^2$	$3{,}0 \times 10^2$	+	*Denitrifikanten*
M42	0,3%	$9{,}0 \times 10^1$	—	+	0
E4/15	0,9%	0	1×10^0	0	0
E114		0	2×10^0	+	0
K6	0	0	$1{,}1 \times 10^2$	0	0
K2	Spuren	0	$1{,}5 \times 10^3$	+ (verzög.)	0
F33	8,5%	0	$6{,}0 \times 10^2$	+	0
S7	20%	0	$1{,}0 \times 10^1$	+ (verzög.)	0

bei einer Verbesserung der Lebensbedingungen[1] Werte bis zur Größenordnung 10^7. Keimreich mit Werten von 1×10^2 aufwärts waren die Melldorf-, Kulenberg- und Fröhlich-Öle mit Ausnahme von M42, das 7% Asphalt enthält und sehr zähflüssig ist. Keimarm mit Keimgehalten bis

[1] Vgl. die Z-Reihen in Tab. 2—4.

$9{,}9 \times 10^1$ waren ferner die Eicklingen- und Schmal-Öle. Von den Keimen, die nur in flüssigen Medien erfaßbar waren, konnte ein Teil nach Vorkultur in verdünnter Fb auf FbAg zum Wachsen gebracht werden.

Die Öle stammen aus geologischen Schichten von verschiedenem Alter und aus verschiedenen Tiefenlagen. Eindeutige Beziehungen zu diesen Faktoren sind ebensowenig wie zu den spärlichen chemischen Daten, etwa zum Wassergehalt, zu erkennen.

Was den Artenbestand anbetrifft (Tab. 6), so scheinen die Nienhagener Öle artenarm, die Melldorfer Öle verhältnismäßig artenreich zu sein, mit Ausnahme von M42. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß mit Sicherheit nur die auf festen Substraten kultivierbaren Formen erfaßt

Tabelle 6. *Mindestbestand an Arten in verschiedenen Ölproben.*

Ölprobe	*Bakterien*	*Desulfurikanten*	*Denitrifikanten*	*Cellulosespalter anaerob*	*Actinomyceten*
M86	4	1	1	1	0
M115	7	0	1	0	2
M42	2	0	0	0	0
E4/15	3	0	0	0	0
E114	2	0	0	0	0
K6	3—4	0	0	0	0
F33	3	0	0	0	1

werden konnten. Die angegebenen Zahlen sind also als Mindestbestand anzusehen. Sehr artenarm scheinen die Öle S7, E114, M42 zu sein. E4/15 dürfte kaum mehr als die nachgewiesenen 3 Stämme enthalten. Unter den Nienhagener Ölen ist wahrscheinlich K6 das artenreichste.

Das Öl M115 wurde in 2 verschiedenen Proben geprüft. Bei der zweiten Probenahme, die 1 Jahr nach der ersten erfolgt war, hatte sich der Keimgehalt fast auf gleicher Höhe gehalten. Von den in der ersten Probe enthaltenen Stämmen ließ sich der Stamm M115a auch bei der zweiten Probe nachweisen.

Auffällig war die auf Bakterienentwicklung beruhende Trübung der Leberbouillon, die meist innerhalb von 10—20 Tagen, in 2 Fällen erst nach etwa 45 Tagen erschien. Bei M86, M115, M42 und F33 waren Subkulturen in Leberbouillon und verdünnter Fb positiv; bei S7 blieb die Subkultur steril. Überraschend hoch war der in E114 mit Leberbouillon ermittelte Keimgehalt: 7 von 10 mit je 0,5 cm^3 Öl beimpfte Röhrchen waren positiv, gegenüber einem mit Fb im Zehntelungsverfahren ermittelten Keimgehalt von 2 Keimen je Kubikzentimeter. Es handelte sich um ein anscheinend in Reinkultur vorhandenes, bewegliches Stäbchen von etwa 1 μ Länge, das in Stichkultur mit FbAg nicht wuchs und sich auch in Leberröhrchen nur über einige Passagen halten ließ.

Der Gehalt an *Desulfurikanten*, *Denitrifikanten* und *anaeroben Cellulosespaltern*, soweit sie sich mit den Spezialsubstraten der üblichen Zusammensetzung nachweisen ließen, war gering.

b) Artzugehörigkeit der isolierten Mikroorganismen.

Es wurden 35 *Bakterien-* und 4 *Actinomyceten*-Stämme isoliert. Bei den Melldorfer Ölen waren sie von festen Medien aus den ersten Keimgehaltsbestimmungen nach der Probenahme abgeimpft worden; bei den übrigen Ölen wurden nur solche erfaßt, bei denen die Übertragung von Fb auf feste Medien gelang. Bei diesen war das Wachstum auf festen Medien zunächst sehr schwach, und 6 von 11 Stämmen hielten sich auf die Dauer nicht auf festen Substraten. Einzelne Stämme, die sich auf der Oberfläche fester Substrate nicht entwickelt hatten, hielten sich längere Zeit bei beschränkter Sauerstoffzufuhr in Stichkultur.

Die *Actinomyceten* gehören zu den Gattungen *Streptomyces* und *Nocardia*. Bei den *Eubakterien* handelt es sich überwiegend um *Mikrokokken* und *sporenlose Stäbchen*. Sporenbildend war nur der Stamm E4/15c, der als *Bacillus cereus* identifiziert werden konnte. *Spirillen* und *Vibrionen* haben wir, abgesehen von *Desulfovibrio*, nicht gefunden. Farbstoffbildner mit rötlichen und bräunlichen Pigmenten waren unter den Mikrokokken häufig. Auch bei den direkt von festen Substraten isolierten Stämmen war das Wachstum der Reinkulturen nicht üppig. In der Regel blieben die Kolonien klein. In FbG-Röhrchen entwickelten sich die meisten Stämme sowohl auf der Oberfläche wie im Stich; etwa ein Drittel der Stämme verflüssigte Gelatine. Von 25 auf verschiedenen Mono- und Disacchariden geprüften Stämmen bildeten nur 9 Säure, meist aus Glucose und Saccharose. Polysaccharide (Inulin, Dextrin, Stärke) wurden nicht angegriffen. Nitrat wurde von der Hälfte der Stämme zu NO_2 reduziert.

Außer dem Sporenbildner konnte bisher keiner der isolierten Stämme mit irgendeiner der in Bergeys Manual anerkannten Arten identifiziert werden. Wir haben uns darauf beschränkt, sämtliche in Reinkultur vorhandenen Stämme zunächst morphologisch und physiologisch zu charakterisieren. Die systematische Bearbeitung soll später an Hand eines umfangreicheren Materials in anderem Zusammenhang erfolgen.

3. Experimentell bewirkte Veränderung des Keimgehaltes.

Wir haben den Einfluß der Lagerung auf den Keimgehalt der Ölproben verfolgt und ferner versucht, den Keimgehalt durch Zugabe von sterilem Wasser oder von Nährstoffen zu verändern, um festzustellen, welche Faktoren etwa im Rohöl das Wachstum beeinflussen. Bei Keimgehaltsbestimmungen wurde auch die qualitative Zusammensetzung so weit wie möglich beachtet, um zu ermitteln, wie die verschiedenen Bakterienstämme eines Öls auf die Zufuhr von Wasser oder von Nährstoffen usw. ansprechen. Es zeigte sich jedoch, daß sich in der Regel alle in der Kultur

nachweisbaren Stämme in wechselnden Verhältnissen vermehrten, wenn eine Reaktion erfolgte; eine starke Förderung eines einzelnen Stammes haben wir nur bei einem Durchlüftungsversuch gesehen. Auf den Grad der Adaptation der im Erdöl lebenden Mikroorganismen ließ sich schließen, wenn man fremde Keime oder ursprünglich aus dem Öl der gleichen Sonde oder aus einer anderen Sonde isolierte Stämme in Öl überführte und ihr Verhalten beobachtete.

Schlüsse aus den Ergebnissen derartiger Versuche auf die Verhältnisse innerhalb der Lagerstätte sind jedoch nur mit Vorbehalt möglich, da unsere Versuche den in der Lagerstätte herrschenden Druck und die von ihm beeinflußten Faktoren unberücksichtigt ließen. Der Einfluß hydrostatischer Drucke und höherer Temperaturen soll in einer besonderen Arbeit behandelt werden.

a) Veränderungen der Keimgehalte bei der Lagerung.

In sämtlichen untersuchten Ölen sank der Keimgehalt schneller oder langsamer während der Lagerung der Proben im Laboratorium (Tab. 7).

Tabelle 7. *Rückgang der Keimzahlen während der Lagerung der Öle.*

Ölprobe	Keimgehalt je cm^3 Öl		
	sofort nach Probenahme	nach 3 Monaten	nach 6 Monaten
K2	$1{,}5\times10^3$	$3{,}0\times10^1$	$4{,}0\times10^1$
M86	$1{,}1\times10^3$	$3{,}0\times10^2$	$4{,}0\times10^1$
F33	$6{,}0\times10^2$	$1{,}1\times10^2$	—
M115	$3{,}4\times10^2$	$2{,}2\times10^2$	$2{,}0\times10^1$
K6	$1{,}0\times10^2$	5×10^0	$1{,}0\times10^1$
M42	$9{,}0\times10^1$	+	+
S7	$1{,}0\times10^1$	5×10^0	—
E114	2×10^0	2×10^0	—
E4/15	1×10^0	+	+

Keine der Proben wurde jedoch während einer Beobachtungsdauer von $1\frac{1}{2}$ bis 2 Jahren steril. Selbst Proben, in denen bei Aussaat von 10 cm^3 Öl kein Ergebnis mehr erzielt werden konnte (M42 und E4/15), erwiesen sich in späteren Versuchen bei Zugabe von Nährstoffen noch als keimhaltig. In einigen Fällen, wie bei K2, war der Rückgang der Keimzahlen innerhalb der ersten 3 Monate der Lagerung besonders auffällig.

Was die Ursachen des Rückganges sind, kann nur vermutet werden. In erster Linie wäre an den allmählichen Verbrauch bestimmter Nährstoffe zu denken, die in den verhältnismäßig kleinen gelagerten Ölproben nicht ersetzt werden können. Nehmen wir an, daß die Keime der Sondenöle überwiegend aus der Lagerstätte stammen, so könnte allein schon die

Druckentlastung und die bei einem Teil der Proben sehr auffällige Entgasung eine Abnahme der an die besonderen Verhältnisse in der Lagerstätte angepaßten Keime bewirken. Es kommen ferner die eigenartigen topographischen Verhältnisse im Ölträger in Frage. In der Lagerstätte bewegt sich das Öl in den Poren des Ölsandes, oder es ist in feiner Verteilung an die ölführende Kreide gebunden. Die Mikroorganismen entwickeln sich unter diesen Verhältnissen mit größter Wahrscheinlichkeit als Aufwuchs. Zu dieser Annahme berechtigen die Beobachtungen über die Keimverteilung in der Erde und im Wasser und die Neigung von Mikroorganismen zur Adsorption an festen Oberflächen, wie es z. B. von Schlammablagerungen bekannt ist. Was mit dem strömenden Öl mitgeführt und mit der Ölprobe an der Sonde entnommen wird, muß sich nun auch in dieser Beziehung unter völlig veränderten Verhältnissen entwickeln und hat nur noch die Möglichkeit, sich an der Glaswand des Gefäßes anzusetzen. Auch bei der Lagerung von Wasserproben ist ein Rückgang der Keimzahlen beobachtet und diskutiert worden (Zobell, 1946a).

b) Erhöhung des Wassergehaltes der Öle.

Im Öl selbst sind nur kleine Wassermengen von 0,03 bis etwa 0,1% löslich. Mit steigendem Wassergehalt erscheinen zunächst tröpfchenförmige Einschlüsse, bis sich schließlich das Öl in geschlossener Schicht auf dem Wasser ansammelt, wie es ja auch im Ölträger auf dem Ölwasser schwimmen kann. Baier (1937) hat vermutet, daß sich Bakterien innerhalb der Lagerstätte nur an der Grenzfläche Öl/Wasser halten können. Wenn auch dem Wasser zweifellos eine große Bedeutung zukommt und Ansammlungen an der Grenzfläche stattfinden werden, so spricht doch das Auftreten von Mikroorganismen in wasserarmen Ölen, die auch in der Lagerstätte keinen unmittelbaren Kontakt mit dem Ölwasser hatten, gegen die Auffassung von Baier. Es ist erstaunlich, daß sich selbst bei sehr geringen Wassergehalten Keime im Öl halten können, und man kann vermuten, daß in diesen Fällen Wasser als begrenzender Faktor wirkt.

Wir haben unseren Ölen steriles aqu. dest. meist in Mengen von 0,4—10 Vol% zugesetzt; in einigen Fällen steigerten wir die Wasserzugabe bis auf 100 Vol%, wobei wir ab 50 Vol% steriles Ltw benutzten. Die Probenahme aus den Versuchskolben erfolgte auch in den Fällen, in denen sich Wasser und Öl in 2 Schichten getrennt hatten, nachdem der Inhalt der Kölbchen durch Schütteln emulgiert worden war.

Eine Reaktion auf den Wasserzusatz war nicht in allen Fällen vorhanden. Bei positiven Ergebnissen reichten meist schon 1,0 Vol% (K6) bzw. 0,4 Vol% (M86, M115) aus, um eine Erhöhung der Keimzahlen herbeizuführen (Tab. 8). Dagegen reagierte F33 erst nach Zugabe von 10 Vol%. Bei den Ölen E4/15, E114 und K2 blieb ebenso wie bei dem

20% Wasser enthaltenden Öl S7 auf Wasserzusätze bis 10 Vol% eine Reaktion aus. In den ersten Tagen stieg die Keimzahl mehr oder weniger steil an, um dann langsam wieder zurückzugehen. Auch nach 2 bzw. 3 Monaten lagen die Werte jedoch noch erheblich höher als bei Versuchsbeginn, wobei der Einfluß verschieden hoher Wassergaben erhalten blieb. Auf das Vorhandensein einer lag-Phase haben wir nicht geachtet.

Tabelle 8. *Einfluß des Wassergehaltes auf den Keimgehalt.*

Ölprobe	AKG	Zugabe von Wasser Vol%	Keimgehalt je cm³ nach 10 Tagen	1 Monat	2 Monaten	3 Monaten
M86	$1{,}0\times10^{1}$	0,4	$5{,}0\times10^{3}$	$8{,}0\times10^{2}$	$6{,}0\times10^{2}$	—
		1	$1{,}0\times10^{5}$	$3{,}6\times10^{4}$	$9{,}0\times10^{3}$	—
		5	$3{,}1\times10^{5}$	$2{,}3\times10^{5}$	$7{,}8\times10^{4}$	—
		10	$4{,}0\times10^{5}$	$2{,}5\times10^{5}$	$1{,}8\times10^{5}$	—
	$8{,}6\times10^{2}$	50	$2{,}0\times10^{6}$	$3{,}2\times10^{5}$	$1{,}4\times10^{5}$	$4{,}0\times10^{4}$
		100	$3{,}0\times10^{6}$	$6{,}0\times10^{6}$	—	$9{,}3\times10^{4}$
M115	$3{,}0\times10^{2}$	0,4	$6{,}0\times10^{3}$	$2{,}0\times10^{3}$	$2{,}2\times10^{3}$	—
		1	$1{,}5\times10^{4}$	$6{,}0\times10^{3}$	$6{,}0\times10^{3}$	—
	$2{,}2\times10^{2}$	5	$7{,}4\times10^{5}$	$2{,}5\times10^{5}$	$4{,}8\times10^{4}$	—
		10	$1{,}2\times10^{6}$	$3{,}0\times10^{5}$	$5{,}0\times10^{4}$	—
	$3{,}0\times10^{2}$	50	$1{,}2\times10^{6}$	$2{,}8\times10^{6}$	$2{,}9\times10^{5}$	$1{,}6\times10^{5}$
		100	$1{,}5\times10^{6}$	$1{,}9\times10^{6}$	$3{,}9\times10^{5}$	$3{,}4\times10^{5}$
K6	$1{,}1\times10^{1}$	1	$3{,}0\times10^{3}$	$1{,}1\times10^{4}$	$8{,}0\times10^{2}$	—
		5	$2{,}2\times10^{4}$	$6{,}0\times10^{3}$	$8{,}0\times10^{3}$	—
F33	$6{,}0\times10^{2}$	10	$2{,}2\times10^{5}$	$8{,}0\times10^{4}$	$1{,}0\times10^{4}$	—

Was die p_H- und r_H-Verhältnisse im wäßrigen Anteil der Öl/Wasser-Gemische anbetrifft, so ergaben die Messungen ein recht einheitliches Bild. Der p_H-Wert lag in der Regel beim Neutralpunkt, der r_H-Wert bei etwa 14. Eine bemerkenswerte Ausnahme machte S 7, dessen wäßriger Anteil bei einem r_H von etwa 13.5 ein p_H von 5,4 aufwies, und vor allem die Probe E4/15, in der sich nach einem Zusatz von 10 Vol% aqu. dest. das Wasser auf $p_H = 4{,}3$—$4{,}5$ und $r_H = 13$ einstellte.

c) Zuführung von Wasser mit anorganischen Salzen und organischen Verbindungen.

Rohöle enthalten nach Zobell (1945) anorganische Salze in einer Menge von 0,1—0,2%. Der Gehalt an N-Verbindungen liegt zwischen 0,1 und 1,5%, an S-Verbindungen zwischen 0,1 und 5,5%. Welchen

Einfluß die Salze auf die im Erdöl lebenden Mikroorganismen haben, ist unbekannt. Wir haben in unseren Versuchen teils einzelne Salze teils Seewasser oder die von Bushnell u. Haas (1941) für die Kultur kohlenwasserstoffabbauender Bakterien benutzte synthetische Nährlösung dem Erdöl zugesetzt. Was den Einfluß organischer Nährstoffe anbetrifft, so hat Zobell (1946b) festgestellt, daß kleine Mengen leicht assimilierbarer C-Verbindungen den Abbau der in Erdölen vorhandenen Kohlenwasserstoffe dadurch fördern, daß sie die Vermehrung der Bakterien in Gang bringen, während größere Mengen den Abbau hemmen. Wir gingen von

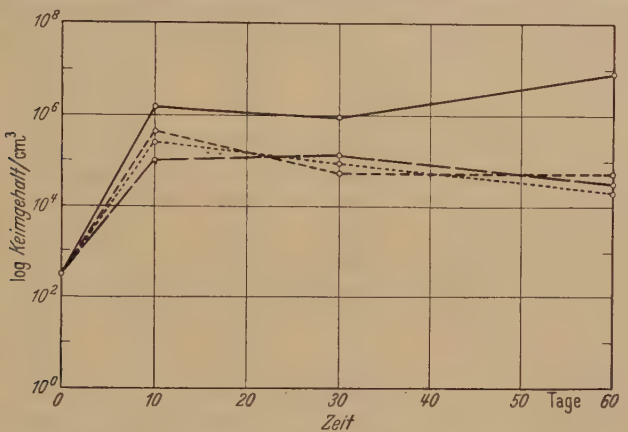


Abb. 1. Verlauf der Wachstumskurven im Öl M 115 nach Zuführung von 5 Vol% aqu. dest., Ltw, Sw und BH-Nährlösung. ..... aqu. dest.; - - - - Lw (Leitungswasser); — — — — Sw (Seewasser); ——— BH (S. 364, Anm. 1).

der Annahme aus, daß den an das Öl adaptierten Bakterien organische C-Verbindungen im Öl selbst zur Verfügung stehen, daß dagegen assimilierbarer Stickstoff als begrenzender Faktor wirksam sein könnte. Hierfür könnten die Beobachtungen über den allmählichen absoluten und relativen Rückgang des N-Gehaltes in marinem Sapropel sprechen, der als Muttergestein des Erdöls angesehen wird. Wir haben daher organische N-freie C-Verbindungen nur gelegentlich zu Vergleichszwecken herangezogen.

Setzt man einem Rohöl 5 Vol% steriles aqu. dest., Leitungswasser oder Seewasser[1] zu, so stimmen die Kurven der Keimzahlen im großen und ganzen überein (Abb. 1). Es zeigte sich bei positivem Verlauf des Versuches nur der schon erwähnte Wassereffekt: die Keimzahlen stiegen schneller oder langsamer an und sanken langsam wieder ab. Anders lagen die Verhältnisse bei Zugabe einer N-haltigen (BH) Nährlösung. Hier waren die Keimzahlen höher, und das Maximum war auch nach 2 Monaten noch nicht erreicht.

[1] Das benutzte Seesalz enthielt weder Nitrat- noch Ammonium-Stickstoff.

Alle weiteren Versuche haben gezeigt, daß der Erhöhung des N-Gehaltes im Öl entscheidende Bedeutung zukommt (Tab. 9). Weder mit Sulfat noch mit Phosphat ließ sich ein deutlicher, außerhalb der Fehlergrenze liegender und reproduzierbarer Keimanstieg erreichen. Durch Zusatz N-haltiger Verbindungen haben wir den N-Gehalt der Öle um 0,01% erhöht und gleichzeitig als Lösungsmittel 1 Vol% aqu. dest. zugesetzt. Als Kontrolle diente destilliertes Wasser. In einigen Fällen wurde die Höhe der Zusätze variiert.

Tabelle 9. *Wirkung der Zufuhr gelöster anorganischer Salze und organischer Verbindungen auf die Vermehrung der Erdölorganismen* [+ bedeutet Keimanstieg, der bei (+) nicht reproduzierbar war; 0 keine Wirkung].

Ölprobe	aqu. dest. 1 Vol%	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	K_2HPO_4	Ca Acetat	Glucose	KNO_3	KNO_2	NH_4Cl	Alanin	Asparagin	Pepton
M86	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+
M115	+	0	(+)	0	+	0	+	+	+	+	+
M42	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+
E4/15	0	0	0	—	0	0	0	0	0	+*	+*
E114	0	0	0	—	0	0	0	+	+	+	+
K6	+	0	0	—	0	0	0	0	0	0	+
K2	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	+**
F33	0	0	(+)	—	0	0	0	0	0	(+)	+
S7	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	+**

* Nur in Verbindung mit $CaCO_3$ wirksam.
** Nur in Verbindung mit BH-Lösung wirksam.

Die Reaktion der Öle auf den N-Zusatz war nur insofern einheitlich, als KNO_2 in allen Ölen ohne Wirkung blieb, während Pepton[1] die stärkste Wirkung ausübte; im einzelnen traten zahlreiche Besonderheiten auf.

M86: Anorganische N-Verbindungen waren ebenso wie Glucose und Ca-Acetat wirkungslos. Alanin, Asparagin und Pepton führten zu erheblichen Keimvermehrungen. Stuft man die dem Öl zugeführten Asparaginmengen zwischen 0,01 und 0,1% entsprechend einem N-Gehalt von 0,002—0,02% ab, so bewegten sich die Keimzahlkurven fast in gleicher Höhe (Abb. 2). Offenbar genügten schon sehr geringe Gaben einer hochwertigen N-Verbindung, um den vorhandenen N-Mangel aufzuheben. Bei weiterer Erhöhung des N-Gehaltes scheinen andere begrenzende Faktoren wirksam zu werden.

M115: Hier sprachen die im Rohöl enthaltenen Mikroorganismen auch auf anorganische N-Verbindungen an (Abb. 3). Die Unterschiede in der Höhe der erreichten Keimzahlen waren erheblich. Am günstigsten wirkten Pepton und Asparagin. Die anorganischen N-Verbindungen zeigten auch bei einer Erhöhung des N-Gehaltes im Öl um 0,03% N keine bessere Wirkung.

[1] Für „Witte-Pepton" wurde entsprechend den vom Hersteller ausgeführten Analysen ein N-Gehalt von 14,7% zugrunde gelegt.

M42: Wegen der Zähflüssigkeit dieses Öles erfolgte die Probenahme aus dem Öl in der Nähe der Grenzfläche Öl/Wasser. Die zugesetzte Wassermenge mußte auf 10 Vol% erhöht werden. Die Keimzahlen waren bei Zugabe von N-Verbindungen zwar gegenüber der Kontrolle erhöht, jedoch waren die Streuungen erheblich, so daß die Aussagen über den Wirkungsgrad der einzelnen Verbindungen zu unsicher sind.

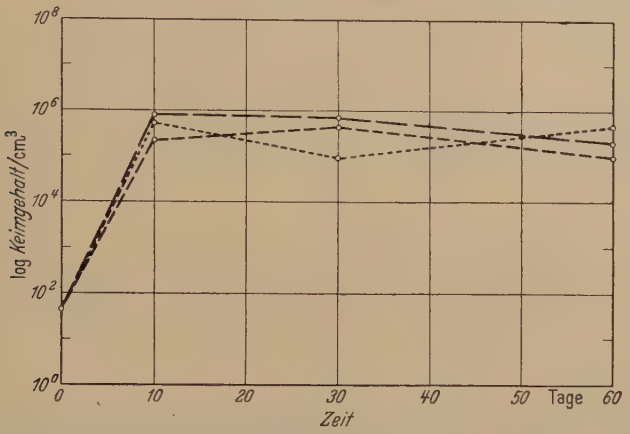


Abb. 2. Verlauf der Wachstumskurven im Öl M 86 nach Zusatz von 2% aqu. dest. und Asparagin in den Konzentrationen 0,01; 0,05 und 0,1%. ..... 0,01%; - - - - 0,05%; ——— 0,1%.

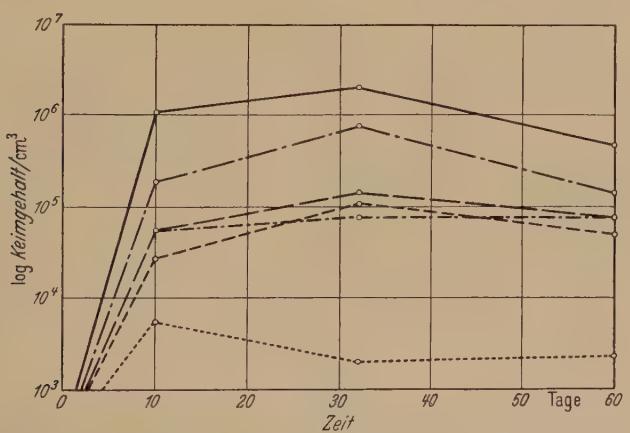


Abb. 3. Verlauf der Wachstumskurven im Öl M 115 nach Zusatz von 0,4% aqu. dest. und 0,01% N als KNO_3, NH_4Cl, Alanin, Asparagin und 0,005% N als Pepton (AKG 3,0 × 10^2). ..... H_2O; - - - - - KNO_3; - - - - NH_4Cl; ——— Alanin; —•— Asparagin; —— Pepton.

E4/15: Das Öl hatte einen sehr geringen Keimgehalt, der auf Zuführung von Wasser nicht ansprach; auch nicht nach Neutralisation der im Öl vorhandenen Säuren durch Zusatz von $CaCO_3$. Bei gleichzeitiger Neutralisation konnte schließlich ein schwacher, sehr langsam verlaufender Keimanstieg mit Pepton und Asparagin erzielt werden; im zweiten Falle jedoch nur, wenn der Wassergehalt um 10 statt 1 Vol% erhöht worden war.

E114: Auch hier war der Keimgehalt sehr niedrig. Als wirksam erwiesen sich NH_4Cl, Alanin, Asparagin und Pepton; KNO_3 war wirkungslos. Erreicht wurden schließlich im günstigsten Fall nach 30 Tagen Keimgehalte um 5×10^3 (Asparagin, Pepton).

K6 und F33: Bei beiden Ölen war nur Pepton wirksam und ergab einen verhältnismäßig geringen Anstieg der Keimzahlen.

K2 und S7: Sämtliche Versuche, den Keimgehalt durch Zugabe von N-Verbindungen, Phosphat oder Glucose zu erhöhen, verliefen negativ, wobei zu beachten ist, daß es sich bei K2 um ein keimreiches Öl handelte. Erst ein Zusatz von Nährlösung nach Bushnell u. Haas (bei K2 1 Vol%, bei S7 5 Vol%) mit 0,05% Pepton führte zu einer schwachen Vermehrung. BH-Nährlösung ohne Pepton blieb ohne Wirkung.

d) Verbesserung der Sauerstoffversorgung.

Da die Rohöle zahlreiche fakultative Aerobier enthalten, war zu prüfen, wie der Keimgehalt auf eine durch Lüftung verbesserte Sauerstoffversorgung reagiert. Mit der Durchlüftung, die täglich während 8 Std erfolgte, ändert sich die Zusammensetzung der Öle; sie werden zähflüssiger, leicht flüchtige Bestandteile entweichen. Die Versuche ließen sich daher nur über wenige Tage ausdehnen. Bei einer Versuchsdauer von 10 Tagen waren nur in den Ölen M86, M 115 und K6 die Keimzahlen gestiegen; in allen anderen Ölen hatte die Durchlüftung keine Veränderungen bewirkt (Tab. 10).

Tabelle 10.

Verhalten der Keimzahlen in Rohölen bei Durchlüftung.

Ölprobe	AKG	Keimgehalt nach Lüftung während 10 Tagen
M86	$1{,}0 \times 10^1$	$3{,}9 \times 10^3$
M115	$2{,}2 \times 10^2$	$1{,}1 \times 10^4$
K6	5×10^0	$8{,}0 \times 10^1$
E114	2×10^0	2×10^0
K2	$3{,}0 \times 10^1$	$1{,}0 \times 10^1$
F33	$3{,}0 \times 10^2$	$2{,}0 \times 10^2$
S7	5×10^0	8×10^0

Die in Leberbouillon wachsenden anaeroben Keime der Öle E114 und F33 ließen sich auch nach der Durchlüftung noch nachweisen. Die Wirkung der Luftzufuhr war bei M115 und M86 recht stark; sie setzte bereits innerhalb der ersten 24 Std ein und hatte nach 10 Tagen offenbar das Maximum noch nicht erreicht. Bei M86 war der Keimanstieg fast ausschließlich an den Bakterienstamm M86a gebunden, dessen Kolonien in den Petri-Schalen zu etwa 98% vertreten waren; bei M115 herrschten die Stämme M115a und b vor.

Um festzustellen, ob allein die mechanische Bewegung des Öles zu einem Keimanstieg führt, wurden Kontrollversuche unter Durchleitung von sterilem, sauerstofffreiem Stickstoff und unter Verwendung eines Rührwerkes angesetzt. Dabei zeigte sich, daß die Keimzahlen zwar um geringe Beträge anstiegen, jedoch nirgends die bei Lüftung erzielten Werte erreichten.

e) Verhalten öleigener kultivierter Keime und fremder Keime bei Übertragungen in Sondenöl.

Mit Rücksicht auf die eigenartigen Lebensverhältnisse in Erdölen und auf den Umstand, daß selbst Sonden desselben Feldes in bakteriologischer Hinsicht Unterschiede zeigten, haben wir versucht, fremde Keime im Rohöl anzusiedeln oder aus Rohölen isolierte Stämme wieder in das gleiche oder in ein anderes Sondenöl zu überführen. Wir unterscheiden öleigene und ölfremde Stämme, letztere besitzen keine nachweisbare Beziehung zum Erdöl oder zu Ölprodukten. Bei den öleigenen Stämmen unterscheiden wir sondeneigene, die aus der gleichen Sonde stammten, in deren Öl sie wieder überführt wurden, und sondenfremde Stämme, die aus anderen Sonden desselben oder eines anderen Ölfeldes oder aus Erdölprodukten stammten. Von einer Sterilisation der als Substrat benutzten Öle im Rückflußkühler haben wir abgesehen, um physikalische und chemische Veränderungen zu vermeiden. Wir haben vor allem Bakterienstämme benutzt, deren Nachweis durch Plattenkultur möglich war und Öle gewählt, deren Keime sich auf festen Substraten nicht erfassen ließen und außerdem die Versuche zu einer Zeit ausgeführt, als der Gehalt an sondeneigenen Keimen in den als Medien benutzten Ölen durch Lagerung bereits weitgehend abgesunken war. Die mit den Keimen zugeführten Wassermengen wurden, von besonderen Fällen abgesehen, so niedrig wie möglich gehalten. Nach Vorversuchen erwies sich eine Einsaatmenge von etwa 10^4 Keimen je Kubikzentimeter Öl als zweckmäßig. Bei niedrigerer Einsaat blieb die Adaptation vielfach aus; bei höheren Einsaaten trat vielfach keine Vermehrung ein, da die Höchstzahlen einer möglichen Entwicklung bereits mit der Einsaat erreicht oder überschritten waren. In Fällen, in denen, wie sich zeigte, die Adaptation der eingeimpften Keime an feste Substrate wieder verloren gegangen war, wurde die Entwicklung der Keimzahlen mit dem Zehntelungsverfahren verfolgt. In diesen Fällen mußte das Verhalten der im Öl selbst enthaltenen Keime durch Kontrollen berücksichtigt werden. In der Hauptsache haben wir mit den Stämmen M115a und LH302a und b[1] gearbeitet, die Nitrat verwerten konnten und durch Gestalt und Farbe der Kolonien leicht zu erkennen waren.

Auch bei diesen Versuchen zeigten sich im Verhalten der einzelnen Öle erhebliche Unterschiede.

[1] Isoliert aus einem Spindelöl-Graphit-Gemisch.

E 4/15: Diese Ölprobe war durch einen niedrigen p_H-Wert aufgefallen und hatte mit einer Vermehrung ihrer eigenen Keime erst nach Neutralisation und Zufuhr von Pepton und Asparagin reagiert. In Versuchen mit 8 Bakterien- und 2 Pilzstämmen[1], darunter die sondeneigenen Bakterienstämme E 4/15a, b, c, waren ohne Neutralisation innerhalb 24 Std sämtliche Stämme außer den sondeneigenen, rückgeimpften abgetötet. In einer Parallelreihe starben bei Neutralisation des Öls mit $CaCO_3$ nur die Pilze ab. Die Keimzahlen von LH302a und b zeigten während einer Beobachtungsdauer von einem Monat nach $CaCO_3$-Zusatz das typische Bild eines langsamen Rückganges. In gleicher Weise verhielten sich E 4/15a, b, c bei saurer und neutraler Reaktion des Öles und bei einer Erhöhung des Wassergehaltes im Öl um 10 Vol%. Bei Verbesserung der Lebensbedingungen trat eine Verschiebung ein: Nach Neutralisation und Zufuhr von 25 Vol% C-freier BH-Lösung setzte bei LH 302a Vermehrung ein, während die Zunahme der sondeneigenen Stämme gering blieb.

Bei den Stämmen E 4/15a, b, c war die hohe Säuretoleranz bemerkenswert. Wir haben 16 aus Rohölen und 4 aus Ölprodukten isolierte Bakterienstämme in Mengen von etwa 10^5 Keimen je cm^3 in sterilem Ltw suspendiert, dessen p_H mit HCl auf Werte zwischen 5 und 1,5 eingestellt worden war (Tab. 11). Bei den höchsten H-Ionenkonzentrationen überlebten schließlich nur noch die Stämme aus E 4/15.

Tabelle 11. *Säureresistenz von Erdölbakterien*
(+ überlebend; 0 abgestorben nach 24 Std).

Stamm	p_H 5,5	5	4,8	4,5	4	3	2,5	1,5
E 4/15a	+	+	+	+	+	+	+	+
b	+	+	+	+	+	+	+	+
c	+	+	+	+	+	+	+	+
HPa	+	+	+	+	0			
M 42b	+	+	+	+	0			
M 115b	+	+	+	+	0			
d	+	+	+	+	0			
LH 302b	+	+	+	0				
c	+	+	+	0				
M 86a	+	+	+	0				
K 2b	+	+	+	0				
K 6b	+	+	+	0				
c	+	+	+	0				
M 42a	+	+	0					
K 2a	+	+	0					
K 6a	+	+	0					
LH 302a	+	0						
M 86b	+	0						
M 115a	+	0						
c	+	0						

E 114: Dieses Öl sprach mit seinen eigenen Keimen auf die Zufuhr von Nährstoffen nur langsam an. Von den eingeimpften Stämmen LH 302a, b und M 115a starben die ersten beiden innerhalb der Beobachtungsdauer ab; die Keimzahlen des dritten waren langsam rückläufig. Zusatz von 0,05% Glucose änderte nichts, abgesehen von einem vorübergehenden kurzfristigen Anstieg der Keimzahlen bei den LH 302-

[1] *Aspergillus*-Stämme aus einem Spindelöl-Graphit-Gemisch.

Stämmen. Dagegen bewirkten 0,01% N als KNO_3 eine wesentliche Verbesserung der Lebensbedingungen: LH 302a zeigte das gleiche Verhalten wie M 115a; beide hielten sich mit Schwankungen etwa auf gleicher Höhe. Auch der empfindliche Stamm LH 302b war nach 30 Tagen noch mit 10^3 Keimen je cm^3 Öl vertreten (Abb. 4a—c).

K 6: Hier verhielten sich LH 302b und M 115a bei Zufuhr von 1 Vol% Wasser rückläufig und waren zwischen dem 10. und 30. Tag ausgestorben. Bei LH 302a sank der Keimgehalt während der ersten Versuchstage stark ab und ging im weiteren Verlauf nur noch langsam zurück. Glucose und KNO_3 waren ohne Einfluß. Dagegen verhielten sich alle drei Stämme nach Erhöhung des Wassergehaltes um 3 Vol% wie sondeneigene Stämme und zeigten einheitlich einen vorübergehenden Keimanstieg von Werten um 6×10^4 auf 6×10^6 und danach wieder einen allmählichen Rückgang auf Werte zwischen 5×10^4 und 5×10^5.

K 2: Keiner der in das Öl eingeführten sondenfremden Keime war entwicklungsfähig. Auf KNO_3 sprach nur M 115a an; außerdem lag hier einer der wenigen Fälle vor, wo Glucose-Zusatz die Entwicklung insofern günstig beeinflußte (Abb. 5a, b), als bis zu 30 Tagen kein Abfall der Bakterienzahlen zu bemerken war.

F 33: Auch hier starben sämtliche zugeführten Stämme selbst bei erhöhter Einsaatmenge innerhalb weniger Tage im Rohöl ab.

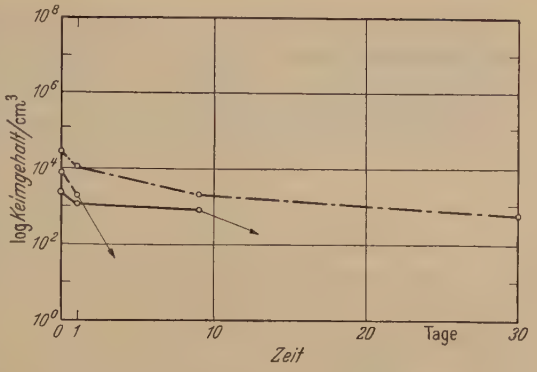


Abb. 4a. Verhalten verschiedener Bakterienstämme im Öl E 114, a) im unveränderten Rohöl.
—— LH 302a; — — — LH 302b; — · — M 115a.

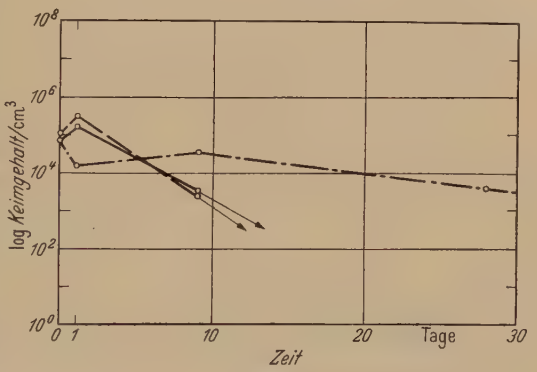


Abb. 4b. Verhalten verschiedener Bakterienstämme im Öl E 114, b) mit 0,05% Glucose.
—— LH 302a; — — — LH 302b; — · — M 115a.

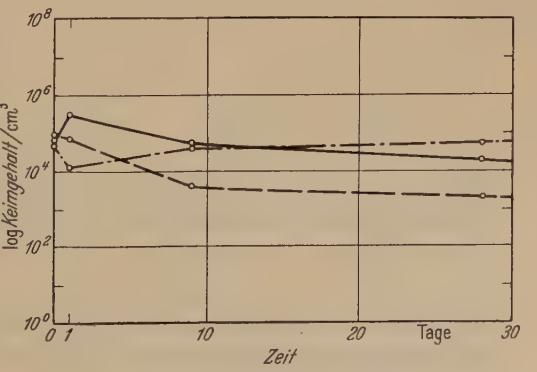


Abb. 4c. Verhalten verschiedener Bakterienstämme im Öl E 114, c) mit 0,01% N als KNO_3.
—— LH 302a; — — —LH 302b; — · — M 115a.

Wirkungslos blieben Zusätze von KNO_3, Pepton, Glucose, ferner von 1 Vol% BH-Lösung mit Pepton. Erst mit 10 Vol% BH-Lösung war schließlich M 115a fähig, sich über einen Monat lang etwa auf gleicher Höhe zu halten. Für die Stämme LH 302a und b waren zur Erzielung desselben Effektes 20 Vol% BH-Lösung erforderlich. Die sondeneigenen Stämme F 33b und c, die im Rohöl schon auf Zusatz von 1 Vol% Wasser mit Pepton angesprochen hatten, konnten sich auch nach Rückimpfung mit 1 Vol% Wasser nach einer Kulturdauer von etwa 3 Monaten auf FbAg sofort an das Öl ohne weitere Zusätze adaptieren.

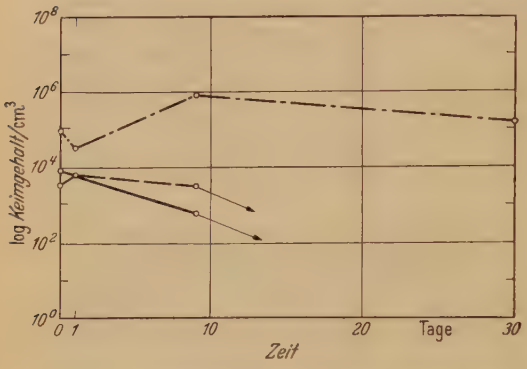


Abb. 5a. Beeinflussung sondenfremder Stämme im Öl K 2 durch KNO_3.
—— LH 302a; — — — LH 302b; — · — M 115a.

S 7: Dieses Öl zeigte den Unterschied zwischen sondeneigenen und sondenfremden Keimen noch deutlicher. Die letzteren hielten sich erst nach Zuführung von 30 Vol% BH-Lösung, während sich Stamm S 7b bei Rückimpfung sofort adaptierte.

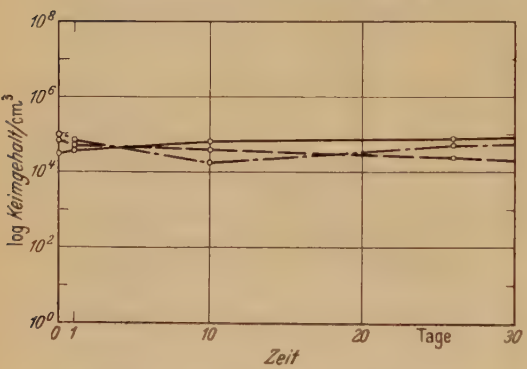


Abb. 5b. Beeinflussung sondenfremder Stämme im Öl K 2 durch Glucose.
—— LH 302a; — — — LH 302b; — · — M 115a.

Die Keime der Nienhagener Öle wuchsen, wie schon erwähnt, mit Ausnahme der E4/15-Stämme bei der Isolierung nur in flüssigen Medien, ließen sich jedoch zum Teil an feste Substrate adaptieren. Bei Rückimpfung in ihr Öl nach Kultur während etwa 3 Monaten auf FbAg ging bei den überprüften Stämmen die Fähigkeit, auf festen Substraten zu wachsen, mehr oder weniger schnell verloren. Bereits bei der Bestimmung der zur Einsaat benutzten Menge lieferte das flüssige Medium meist höhere Keimzahlen als die Plattenkultur (Tab. 12). Demnach scheint selbst bei längerer Kultur die Adaptation dieser Keime an feste Substrate nur unvollkommen zu sein.

In einer weiteren Versuchsreihe haben wir das Verhalten von Stamm M115a in fremden Rohölen bei Durchlüftung und Zufuhr von N-Verbindungen untersucht (Tab. 13).

Während sich im Öl K6 sondenfremde Stämme sonst nur bei Zugabe von 3 Vol% Wasser vermehrten, war bei Durchlüftung schon mit 1 Vol%

Wasser ein Keimanstieg zu verzeichnen. Auch in K 2 setzte bei Durchlüftung Vermehrung ein, die sonst an die Zufuhr von KNO_3 oder Glucose gebunden war. In allen Fällen bewirkte die Zufuhr von Pepton bei gleichzeitiger Durchlüftung eine verstärkte Vermehrung. Bei S 7 ermöglichte erst Lüftung, verbunden mit Peptonzufuhr, eine kräftige Vermehrung.

Tabelle 12. *Keimzahlen von sondeneigenen Keimen nach Rückimpfung in das eigene Öl, festgestellt auf festen und in flüssigen Substraten*.*

Stamm	Einsaatmenge je cm³ Öl, festgestellt mit		Keimgehalt je cm³ Öl nach			
			10 Tagen festgestellt mit		30 Tagen festgestellt mit	
	FbAg	Fb	FbAg	Fb	FbAg	Fb
K 6b	$2{,}6 \times 10^2$	$2{,}2 \times 10^4$	0	—	0	$1{,}1 \times 10^4$
F 33c	$1{,}2 \times 10^3$	$1{,}1 \times 10^4$	0	$1{,}1 \times 10^4$	0	$1{,}0 \times 10^3$
E 114a	$4{,}4 \times 10^4$	—	$3{,}4 \times 10^4$	$2{,}4 \times 10^5$	$3{,}0 \times 10^2$	$2{,}0 \times 10^4$

* Bei diesen Versuchen lag der Keimgehalt der benutzten Öle vor der Beimpfung in K 6 und E 114 bei weniger als 1×10^1, in F 33 bei weniger als 1×10^2 Keimen je cm³.

Tabelle 13. *Verhalten von Stamm M 115a in verschiedenen Ölen bei Durchlüftung und N-Zufuhr*
(0,01% N als Pepton; Wasserzusatz 1 Vol%).

Stamm M 115a in	Versuchsbedingungen	AKG	Keimgehalt je cm³ Öl nach		
			1 Tag	3 Tagen	10 Tagen
K 6	nicht gelüftet	$8{,}8 \times 10^3$	$4{,}5 \times 10^3$	—	$6{,}0 \times 10^3$
	gelüftet	$1{,}3 \times 10^4$	$4{,}0 \times 10^4$	$1{,}5 \times 10^5$	$9{,}8 \times 10^4$
	gel. + Pepton	$5{,}5 \times 10^4$	$8{,}6 \times 10^5$	$3{,}7 \times 10^6$	$1{,}0 \times 10^6$
K 2	nicht gelüftet	$8{,}8 \times 10^3$	$3{,}7 \times 10^3$	—	$1{,}0 \times 10^2$
	gelüftet	$1{,}3 \times 10^4$	$6{,}4 \times 10^4$	$1{,}2 \times 10^5$	$1{,}9 \times 10^5$
	gel. + Pepton	$5{,}5 \times 10^4$	$2{,}1 \times 10^5$	$8{,}7 \times 10^5$	$1{,}3 \times 10^6$
S 7	nicht gelüftet	$8{,}8 \times 10^3$	$1{,}6 \times 10^4$	—	0
	Pepton	$3{,}1 \times 10^4$	$4{,}0 \times 10^4$	—	$7{,}0 \times 10^3$
	gelüftet	$1{,}3 \times 10^4$	$7{,}1 \times 10^3$	$3{,}9 \times 10^2$	+
	gel. + Pepton	$5{,}5 \times 10^4$	$1{,}3 \times 10^6$	$9{,}0 \times 10^5$	$4{,}2 \times 10^5$

Ganz anders war das Verhalten beliebiger, aus Wasser und Luft isolierter, ölfremder Bakterienstämme. Sie wurden in Öl E 4/15 eingebracht, das nach Neutralisation der Verwertung durch sondenfremde Mikroorganismen relativ leicht zugänglich ist. Von 10 Stämmen starben nach

Einsaaten von über 10^4 Keimen je Kubikzentimeter 3 innerhalb 24 Std, 4 weitere innerhalb 20 Tagen ab. Eine Ausnahme machten 2 *Fluorescenten*, die nach 3 Monaten noch in Keimzahlen um 10^3 vorhanden waren, jedoch erst bei einer Erhöhung des Wassergehaltes im Rohöl um 10 Vol%.

III. Diskussion der Ergebnisse.

In sämtlichen untersuchten Ölen ließen sich Mikroorganismen in wechselnder Zahl, in erster Linie Eubakterien, nachweisen und in ihrer Entwicklung im Öl in der einen oder anderen Weise experimentell beeinflussen.

Als Standort von Mikroorganismen ist Erdöl in verschiedener Hinsicht durch die Besonderheiten der Lebensbedingungen ausgezeichnet. Der Wassergehalt ist gering. Molekular gelöst können in Paraffinkohlenwasserstoffen und aromatischen Kohlenwasserstoffen nur unter 1% liegende Spuren vorhanden sein. Größere Wassermengen sind zunächst in Tropfenform im Öl emulgiert, bis bei weiter steigendem Wassergehalt, je nach den herrschenden Bedingungen, eine Emulsion von Öl in Wasser entsteht, oder Öl und Wasser sich trennen. Das Ölwasser der Erdöllagerstätten ist Salzwasser, dessen Salzgehalt erheblich über dem des Meerwassers liegen kann und z. B. im Schacht Wietze im Hannoverschen Erdölgebiet Werte von 20% erreicht. In seiner chemischen Zusammensetzung unterscheidet es sich vom Meerwasser und ist unter anderem durch das mehr oder weniger vollständige Fehlen von Sulfaten, was Bastin (1926) und Ginsburg-Karagitschewa (1937) mit Desulfurikation in Verbindung gebracht haben, sowie durch das Auftreten gewisser Spurenelemente gekennzeichnet. Zerbe (1952) nennt als Bestandteile NaCl, SiO_2, Eisen, Aluminium, Calcium, Radium, Helium, Vanadium. Erdöl enthält zwar 0,01—2,2% Stickstoff, es sind jedoch Verbindungen, die als schwer angreifbar gelten, soweit sie überhaupt untersucht worden sind: Pyridine, Chinoline, Hydropyridine und Hydrochinoline. Auf Grund unserer Kenntnisse über die Entstehungsgeschichte des Erdöls darf man annehmen, daß der leicht assimilierbare Stickstoff längst verbraucht ist. Ferner sind vorhanden kleine Mengen von Sauerstoff- und Schwefelverbindungen: Naphthensäuren, Fettsäuren, Harze, Phenole, Ester organischer Säuren; Mercaptane, Dialkylsulfide, Thiophene usw., Pyrrolderivate, Sterine. Selbst innerhalb desselben Horizontes einer Lagerstätte ist das aus verschiedenen Sonden entnommene Öl in seiner chemischen und physikalischen Beschaffenheit nicht immer einheitlich. Davon abgesehen überwiegen in tieferen (älteren) Horizonten paraffinische, in höheren (jüngeren) Horizonten naphthenische Öle.

Soweit Mikroorganismen Kohlenwasserstoffe im Stoffwechsel verwerten können, erfolgt der Angriff bevorzugt unter aeroben Bedingungen. Der anaerobe Abbau ist wesentlich schwieriger und oft mit Desulfurikation und Denitrifikation verbunden, die Zahl der beteiligten Arten von Mikroorganismen ist wesentlich geringer. Innerhalb der Lagerstätte herrschen anaerobe Bedingungen. Wird das Öl an der Erdoberfläche entnommen, so befindet es sich mit den darin enthaltenen Mikroorganismen in verschiedener Hinsicht in einem labilen Zustand. Das Öl ist von Lagerstättendruck entlastet, der mehr als 100 atm betragen kann; in vielen Fällen entweichen gelöste Gase aus dem Öl, so daß es schäumt wie eine gärende Flüssigkeit. Die Berührung mit der Luft führt zu Oxydations-

prozessen und zu Veränderungen des Redoxpotentials. Diesen Veränderungen sind die Mikroorganismen bei der Isolierung aus dem Sondenöl ausgesetzt, und selbst bei Entnahme von Proben unmittelbar aus der Lagerstätte in Erdölschächten ist ein Teil der Veränderungen bereits eingetreten. Im mehr oder weniger schroffen Wechsel der Lebensbedingungen mag einer der Gründe dafür liegen, daß vorerst noch zwischen den durch Zählung nach vorhergegangener Ausschlämmung des Ölträgers (Exserzew, 1952) und den durch Kultur ermittelten Keimzahlen ein erheblicher Unterschied besteht. Ein weiterer Grund liegt darin, daß wir offensichtlich noch nicht in der Lage sind, sämtlichen im Erdöl lebenden Mikroorganismen in der Kultur geeignete Substrate anzubieten. Ein Universalsubstrat gibt es hier ebensowenig wie in der Boden- und Wasserbakteriologie.

In der Lagerstätte ist das Öl im Trägergestein mit sehr großer innerer Oberfläche verteilt und gemeinsam mit den Mikroorganismen den Vorgängen der Adsorption und Elution ausgesetzt; im Sondenöl ist dieses komplizierte System zerstört. An den Wänden der Sondenrohre können Substanzen aus dem Öl abgelagert werden, die keimhaltig sind und aus denen z. B. der Stamm HPa isoliert worden ist; auch den Stamm M115a halten wir für einen Bewohner des Sondenrohres. Was die Verteilung der Mikroorganismen in der Lagerstätte anbetrifft, so muß man in Analogie zu den Verhältnissen im Boden und in den Ablagerungen der Gewässer und nach Beobachtungen an Ölen von verschiedenem Wassergehalt sowie an Öl/Wasser-Gemischen annehmen, daß zwar die Grenzfläche Ölwasser/Öl ein bevorzugter Standort ist, daß aber, wie man früher zuweilen angenommen hat (Baier, 1937), Mikroorganismen keineswegs auf diese Zone beschränkt sind, sondern selbst in wasserarmen oder praktisch wasserfreien Ölen entwicklungsfähig sind. Innerhalb der Lagerstätte werden sie sich hauptsächlich als Aufwuchs auf den Partikeln des Ölträgers entwickeln und nur zum geringeren Teil frei beweglich sein und dann gewissermaßen im Öl flottieren. Im einzelnen bedarf es noch eingehender Untersuchungen an Mikrokulturen, um die Eigenarten der Lokalisation in einem wasserarmen Medium zu klären.

Unter Berücksichtigung der Verhältnisse in der Lagerstätte war zu erwarten, daß bei der Kultur der in Erdöl lebenden Bakterien mit einem hohen Prozentsatz wahrscheinlich obligater Anaerobier und mit der Anwesenheit von Halophilen gerechnet werden mußte und daß ferner bei der Verwendung von Erdöl als Kulturmedium die darin enthaltenen Keime auf eine Erhöhung des Wassergehaltes und auf die Zufuhr von leicht assimilierbaren N-Verbindungen, vielleicht auch von N-freien Mineralsalzen, ansprechen würden. Ferner war bei den Autochthonen und bei den im Öl vorkommenden Allochthonen eine mehr oder weniger strenge adaptive Bindung an die als C-Quelle im Erdöl zur Verfügung

stehenden Substanzen, also in erster Linie an Kohlenwasserstoffe, zu erwarten.

Unsere Versuche haben nur teilweise diese Annahmen bestätigt. Eine Erhöhung des Salzgehaltes im Nährsubstrat war nur von geringer Bedeutung. Das von Zobell (1946a) für die Kultur mariner Bakterien benutzte Substrat 2216 gab keineswegs höhere Keimzahlen und vor allem keine anderen Arten als salzarme verdünnte Fleischbouillon. Es sind also bisher zwar halotolerante aber keine obligat halophilen Arten in der Kultur nachweisbar. Im Verhalten zum Sauerstoff herrschen die anpassungsfähigen fakultativen Anaerobier und Aerobier vor; auch Zobell (1946b) hat auf das Anpassungsvermögen vieler Kohlenwasserstoffspalter hingewiesen, die selbst bei einer Sauerstoffspannung von 0,1 mg/l noch gutes Wachstum zeigen. Diese Feststellung bedarf allerdings einer bei allen Kulturversuchen generell vorhandenen, aber hier besonders auffälligen Einschränkung: In vielen Fällen ließen sich Kulturen nur in flüssigen Medien gewinnen, und gerade in diesen Medien, besonders in Leberbouillon, könnten sich obligate Anaerobier entwickelt haben, deren Abtrennung und Reinkultur bisher nicht gelungen ist. In die gleiche Richtung deuten die Untersuchungen, die Müller u. Schwartz (1948) in Erdölschächten vorgenommen haben. So fehlte z. B. unter den bisher isolierten Stämmen die Gattung *Clostridium* vollständig. Das ist insofern bemerkenswert, als neuerdings Prevot (1948) für einige saprophytische Clostridien die Beteiligung an den Prozessen der Kohlenwasserstoffbildung und Desulfurikation in Anspruch nimmt. Von den in Reinkultur untersuchten Bakterienstämmen waren über $^3/_4$ aerob/anaerob. Das Vorherrschen derartiger Formen spricht, verbunden mit anderen Beobachtungen, dafür, daß, entgegen der ursprünglich von Müller u. Schwartz (1948) geäußerten Zurückhaltung, ein großer Teil der im Sondenöl nachgewiesenen Mikroorganismen aus der Lagerstätte selbst stammen könnte. Fakultativ aerob/anaerobe Formen scheinen auch unter anderen Verhältnissen in Sedimenten und Sedimentgesteinen bevorzugt aufzutreten. Zobell (1945) fand sie in marinen Sedimenten in erheblicher Tiefe. Lieske u. Hoffmann (1928) haben in Braunkohlen- und Steinkohlenflözen fakultative Anaerobier nachgewiesen.

Es hat sich zwar durchweg bestätigt, daß die Lebensbedingungen in Öl keineswegs optimal sind, aber Wassermangel scheint unter den begrenzenden Faktoren eine geringere Bedeutung zu haben, als wir erwartet hatten. Dagegen erbrachten zahlreiche Versuche den Beweis dafür, daß die N-Versorgung im Öl mangelhaft ist. Von 9 Ölen sprachen 7 auf die Zufuhr von Stickstoffverbindungen mit einer Erhöhung der Keimzahl an, wobei durchweg hochwertige N-Verbindungen wie Pepton und Asparagin stärkere Anstiege der Keimzahl ergaben als Nitrat und anorganisch gebundener Ammoniumstickstoff. Daß neben und außer

Stickstoff noch andere begrenzende Faktoren wirksam sein können, geht aus dem günstigen Einfluß der C-freien Nährlösung nach Bushnell u. Haas hervor, der durch Stickstoffverbindungen allein nicht ersetzt werden konnte.

Eine Aktivierung der mikrobiellen Prozesse gelingt auch bei Verbesserung der Sauerstoffversorgung durch Lüftung, was mit Rücksicht auf das fakultative Verhalten zahlreicher Erdölbakterien gegenüber dem Sauerstoff und auf die leichtere Zugänglichkeit der Kohlenwasserstoffe unter aeroben Bedingungen verständlich ist.

In der Frage der adaptativen Bindung an das Erdöl fanden wir unsere Annahmen bestätigt. Vergleicht man das Verhalten öleigener und ölfremder Bakterien, so wird die Bindung der ersten Gruppe an das Erdöl mit seinem Gemisch schwer zugänglicher Kohlenwasserstoffe bei Gegenwart bakteriostatischer oder bactericider Substanzen und bei den in manchen Ölen vorhandenen hohen H-Ionenkonzentrationen deutlich. Selbst innerhalb desselben Ölfeldes können entsprechend den Unterschieden in der chemischen und physikalischen Beschaffenheit in mikrobiologischer Hinsicht Unterschiede zwischen verschiedenen Sonden vorhanden sein, und es gelingt keinesfalls immer, aus der einen Sonde isolierte Bakterienstämme in das Öl einer anderen Sonde zu übertragen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß bei dem Verhalten nicht adaptierter Stämme bactericide oder bakteriostatische Wirkungen einzelner Öle mitgespielt haben, eine Vermutung, die eingehender geprüft werden muß. Bei 5 Rohölen erfolgte Wachstum der im Öl enthaltenen Mikroorganismen nur in flüssigen Medien, und die Gewöhnung an feste Substrate war hier nicht in allen Fällen möglich. Zugabe von Glucose als C-Quelle hatte nur ausnahmsweise Einfluß auf die Keimzahl im Öl, jedoch sind in dieser Beziehung, um die Frage der Verwertbarkeit von C-Verbindungen zu klären, weitere Versuche mit N-freien C-Verbindungen erforderlich; es wäre ja denkbar, daß die gute Wirkung organischer N-Verbindungen zum Teil auf ihrer gleichzeitigen Verwendung als C-Quelle beruht. Für viele Erdölbakterien ist eine geringe biochemische Aktivität charakteristisch; Zuckerarten werden verhältnismäßig selten von den Reinkulturen unter Gas- und Säurebildung verwertet, ebenso sind Indol- und Schwefelwasserstoffbildung in der Regel negativ, und Gelatine wird von der Mehrzahl der Stämme nicht oder nur sehr langsam verflüssigt.

So ergibt sich also das Bild einer hochgradig angepaßten, aus *Eubakterien* und *Actinomyceten* bestehenden Mikroflora. Wenn wir von Spezialisten wie *Desulfurikanten* und *anaeroben Cellulosespaltern* absehen, so ist die Lebensgemeinschaft, soweit wir heute die Verhältnisse überblicken können, gekennzeichnet durch das Vorherrschen fakultativ aerob/anaerober, halotoleranter Formen, die in der Kultur meist schlecht oder mittelmäßig wachsen und biochemisch gegenüber den üblichen

Medien wenig aktiv sind. Sie sind angepaßt an ein Milieu, das durch meist geringe Wassergehalte und durch im allgemeinen schwer angreifbare C-Verbindungen ausgezeichnet ist. Ihre Anpassung an die in Rohölen vorhandenen N-Verbindungen scheint unvollkommen zu sein. Sie sprechen in vielen Fällen auf die Zufuhr von Wasser und auf eine Verbesserung der N-Versorgung mit einer Erhöhung der Keimzahl an, wobei auffällt, daß häufig nur hochwertige organische N-Verbindungen wirksam sind.

Macht man den Versuch, die hier behandelten 9 Rohöle in mikrobiologischer Hinsicht zu gruppieren, so erkennt man sehr bald das Problematische eines solchen Unternehmens. Nimmt man die Menge der im Rohöl enthaltenen Keime und deren Reaktion auf Zusätze von Wasser oder von Nährstoffen sowie das Verhalten ölfremder Keime als Kennzeichen für die Aktivität, so lassen sich zwar Sondenöle mit hoher und geringer mikrobieller Aktivität der öleigenen Keime unterscheiden, ferner solche, die ölfremden Keimen leichter oder schwerer zugänglich sind, es gelingt dagegen nicht, diese Eigenschaften zum Wassergehalt des Öles, zur Zugehörigkeit zu einem bestimmten Ölfeld oder zur Tiefenlage und zum geologischen Alter in Beziehung zu setzen.

Die Verteilung der Mikroorganismen innerhalb der Lagerstätte scheint wesentlich verwickelter zu sein, als man bisher annahm; auch die in anderem Zusammenhang ausgeführten neuen Untersuchungen an Schachtölen deuten in diese Richtung. Es ist nicht ausgeschlossen, daß Areale, die sich nach Art, Menge und Aktivität der vorhandenen Mikroorganismen unterscheiden, nebeneinander existieren. Beziehungen zur chemischen und physikalischen Beschaffenheit der einzelnen Sondenöle sind zweifellos vorhanden, aber, von einzelnen Ausnahmen abgesehen, sind sie uns unbekannt und die uns zugänglichen Analysendaten reichen nicht aus, sie zu erkennen.

Es wird kaum ein anderer Weg weiterführen als die wiederholte bakteriologische Kontrolle sämtlicher Sonden eines Ölfeldes, verbunden mit der Ermittlung der wesentlichen chemischen und physikalischen Daten und die Testung der isolierten Stämme im Verhalten gegenüber einzelnen Erdölkohlenwasserstoffen und anderen Erdölbestandteilen.

Zusammenfassung.

1. Die aus den Ölfeldern Heide/Holstein und Nienhagen/Hannover an der Erdoberfläche aus Ölsonden aseptisch entnommenen Ölproben waren sämtlich keimhaltig; sie enthielten *Bakterien* und vereinzelt *Actinomyceten*.

2. Zum Nachweis der im Erdöl lebenden Mikroorganismen erwiesen sich verdünnte Fleischbouillon oder Fleischbouillonagar als geeignet, in einigen Fällen jedoch nur bei Verwendung des flüssigen Mediums.

3. Obligat halophile Keime haben wir in unseren Ölproben nicht angetroffen.

4. Der größte Teil der isolierten Mikroorganismen entwickelte sich unter aeroben und anaeroben Bedingungen; außerdem waren obligate Anaerobier und vereinzelt obligate Aerobier vorhanden.

5. Die Keimgehalte lagen in frisch entnommenen Ölproben nach dem Plattenverfahren von Koch, dem Zehntelungsverfahren von Schütz und bei Kultur in hoher Schicht nach Burri zwischen 1×10^0 und $1{,}5 \times 10^3$ Keimen je Kubikzentimeter Öl.

6. Der gefundene Artenbestand war gering, im Minimum etwa zwischen 1 und 10 Arten.

7. Der Gehalt an kultivierbaren *Desulfurikanten*, *Denitrifikanten* und *anaeroben Cellulosespaltern* war auffällig niedrig; es muß jedoch damit gerechnet werden, daß die vorhandenen obligaten Anaerobier noch nicht vollzählig erfaßt worden sind.

8. In sämtlichen untersuchten Ölproben nahm der Keimgehalt während der Lagerung schneller oder langsamer ab; die Proben wurden jedoch während einer Beobachtungsdauer bis zu 2 Jahren nicht steril.

9. Eine Erhöhung des Keimgehaltes im Öl gelang mehr oder weniger leicht durch Zuführung von Wasser, N-Verbindungen oder anorganischer Nährlösung, in einigen Fällen auch nach Lüftung. Dagegen war nur in einzelnen Fällen ein Einfluß organischer N-freier C-Verbindungen festzustellen.

10. Von 9 Ölen sprachen 3 bereits auf eine Erhöhung des Wassergehaltes um 0,4—10 Vol% an, 7 auf eine Zufuhr von Wasser mit gelösten N-Verbindungen und 2 nur auf die Zufuhr einer anorganischen Nährlösung mit Zusatz von Pepton.

11. Nitrit-Stickstoff war weder bei den Rohölen von Einfluß, noch ließ er sich von den in Reinkultur vorliegenden Stämmen verwerten. Auf NO_3- oder anorganisch gebundenen NH_4-Stickstoff und auf organische N-Verbindungen reagierten 3 Öle, während bei 6 Ölen organisch gebundener Stickstoff in Form von Alanin, Asparagin, Pepton für eine Vermehrung der sondeneigenen Bakterien erforderlich war.

12. Die hohe Anpassung an das Erdöl zeigte sich darin, daß selbst öleigene Stämme auf dem Wege über die Reinkultur nicht beliebig zwischen den einzelnen Sondenölen ausgetauscht werden können.

13. Die meisten den Rohölen zugeführten ölfremden und sondenfremden Keime starben in kürzester Zeit ab. Hierbei spielte in einem Falle (E4/15) die hohe H-Ionenkonzentration eine Rolle, in anderen Fällen ist, abgesehen von ernährungsphysiologischen Faktoren, eine bactericide Wirkung von Ölbestandteilen nicht ausgeschlossen.

14. Die Öle erwiesen sich teils als schwer verwertbar für Mikroorganismen, teils als verhältnismäßig leicht angreifbar und dann auf Zusätze von Wasser usw. ansprechend, in einem Falle nach Neutralisation der vorhandenen Säure.

Literatur.

Appert, J.: Bactériologie du pétrole. Rev. Inst. Franc. Pétrole et Ann. Combustible liquides **7**, 170 (1952). — Baier, C. R.: Bakteriologische Erdölstudien. Kiel. Meeresforsch. **2**, 149 (1937). — Barker, H. A.: Studies on the methane producing bacteria, Arch. Mikrobiol. **7**, 420 (1936). — Bastin, E. S., F. E. Greer, C. A. Merrit, and G. Moulton: The presence of sulphate-reducing bacteria in oil fields waters. Science (Lancaster, Pa.) **63**, 21 (1926). — Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 6. Aufl. Baltimore 1948. — Bushnell, L. D., and H. F. Haas: The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. J. Bacter. **41**, 653 (1941). — Dorner, W.: Methoden zur Untersuchung von Bakterienreinkulturen. Hannover: M. u. H. Schaper 1933. — Exserzew, W. A.: Mikroskopisch-bakteriologische Untersuchungen an der Naphtha-haltigen Facies Baku II. Mikrobiologija (russ.) **20**, 324 (1952). — Ginsburg-Karagitschewa, T. L.: Microbiological research in the sulphurous and salty waters of Aspheron. Azerbajdzanskoe Neftjanoe Khozjajstvo, Baku 1926 (russ.). — Ginsburg-Karagitschewa, T. L.: Über die Ursachen des schwachen Sulfatgehaltes der Ölwässer. Petroleum **33**, 7 (1937). — Janke, A.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, I. Allgemeine mikrobiologische Methoden. Dresden und Leipzig 1946. — Krombholz, E., u. W. Lorenz: Über eine exakte Methode der mikrobiellen Titerbestimmung. Zbl. Bakter. I. **104**, 277 (1927); **114**, 138 (1929). — Lieske, R., u. E. Hofmann: Untersuchungen über die Mikrobiologie der Kohlen und ihrer Lagerstätten. 1. Die Mikroflora der Braunkohlengruben. Brennstoff-Chemie **9**, 174 (1928). — 2. Die Mikroflora der Steinkohlengruben. Brennstoff-Chemie **9**, 282 (1928). — Müller, A., u. W. Schwartz: Untersuchungen zur Erdölbakteriologie I. Arch. Mikrobiol. **14**, 291 (1948). — Omelianski, W.: Über die Gärung der Cellulose. Zbl. Bakter. II. **8**, 193 (1902). — Prevot, A. R.: Recherches sur la réduction des sulfates et des sulfites minéraux par les bactéries anaérobies. Ann. Inst. Pasteur **76**, 102 (1948). — Schwartz, W., u. A. Müller: Erdölbakteriologie. Erdöl und Kohle **1**, 232 (1948). — Geomikrobiologie, Entwicklung und Stand eines neuen Forschungsgebietes. Erdöl und Kohle **6**, 523 (1953). — Skerman, V. B. D.: A mechanical key for the generic identification of bacteria. Bacter. Rev. **13**, 175 (1949). — Starkey, R. L.: A study of spore formation and other morphological characteristics of Vibrio desulfuricans. Arch. Mikrobiol. **9**, 268 (1938). — Waksman, S. A., and C. Carey: The use of the silica gel plate for demonstrating the occurrence and abundance of cellulose-decomposing bacteria. J. Bacter. **12**, 87 (1926). — Zerbe, C.: Mineralöle und verwandte Produkte. Berlin, Göttingen, Heidelberg 1952. — ZoBell, C. E.: The role of bacteria in the formation and transformation of petroleum hydrocarbons. Science (Lancaster, Pa.) **102**, 364 (1945). — Marine Microbiology. Waltham, Mass., USA (1946a). — Actions of microorganisms on hydrocarbons. Bacter. Rev. **10**, 1 (1946b).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 391—397 (1954).

(From the Marine Station, Millport, Scotland.)

Conditions governing Haematochrome Formation and Loss in the Alga Haematococcus pluvialis Flotow.

By
M. R. Droop.

With 2 figures in the text.

(Eingegangen am 19. März 1954.)

The phytoflagellate *Haematococcus pluvialis* is one of the organisms responsible for the blood-red colour of small ephemeral pools on naked rock and ecologically similar habitats (Droop, 1953).

The colouring matter in this organism, like that in *Trentepohlia* and *Euglena sanguinea*, has received much attention in the past under the term "haematochrome" (for a detailed review of the literature cf. Goodwin, 1952). In *Haematococcus*, the principal pigment is known to be astaxanthine (Tischer 1944); however, in the biological discussion it is convenient to continue with the use of the old term.

In living cells the carotenoid is dissolved in oil droplets, which in the motile state are situated mostly between the parietal chromatophore and the nucleus, while in the resting spore they frequently mask the chromatophore completely.

It is clear from the researches of Reichenow (1909), Pringsheim (1914) and R. Chodat & Mayer (1927) that the two most important factors responsible for haematochrome formation are deficiency of nitrogen and strong illumination. Lwoff & Lwoff (1930), working on the heterotrophic carbon nutrition of flagellates, found that acetic acid favours haematochrome formation, acetic acid being the organic carbon source most easily assimilated by *Haematococcus*. This led F. Chodat (1938) to formulate the general hypothesis that the carbon/nitrogen balance in the medium determines the degree of carotenoid formation. This hypothesis is plausible, but as yet untested as far as algae are concerned. The experiments to be described were, among others, undertaken with the object of doing so. They were carried out with pure cultures of strain *34/1e* from the Culture Collection of Algae and Protozoa, The Botany School, Cambridge.

Carbon Dioxide, Light, Acetate, and Nitrate.

If the hypothesis covers all the facts, one would expect haematochrome formation to be independent of light to the same extent as growth is, and its formation to be affected by carbon dioxide.

The first experiment deals with the effects of four factors: carbon dioxide, light, acetate, and nitrate.

There are 16 possible treatments involving four factors, when each of them is presented at one of two levels. The experiment, which was repeated seven times, was carried out on a soil extract agar basal medium. Cultures receiving the nitrate treatment contained 200 mg. KNO_3/l., and those receiving the acetate treatment 500 mg. anhydrous CH_3COONa/l. The cultures, agar slants, were placed without plugs in closed museum jars which contained 300 ml. of either strong KOH (for the low CO_2 treatment) or a Palitzsch borax-boric acid buffer, p_H 8, with 0.01 M $NaHCO_3$ equivalent to 0.4% CO_2 at 18° C and 760 mm Hg (for the high CO_2 treatment). Those grown in the light received 200 ft. candles "warm white" fluorescent light for 16 hours each day. The relative amount of haematochrome formation in any two cultures on agar could be assessed by eye after a period of two weeks' growth. These comparisons were only made between cultures differing in their treatments with respect to one of the four factors; there are, therefore, eight comparisons for each factor; that is, 56 in all.

The results are shown in Tables I—III. It is not intended to discuss all the possible interactions which the factorial treatment is able to show, but only those between the effects of one nutrient and light.

Table I.

Effect of nitrate on haematochrome formation. The entries refer to numbers of comparisons of pairs of cultures differing in their treatment with respect to nitrate.

Condit.	Light	+	+	+	+	—	—	—	—	
	Acetate	+	+	—	—	+	+	—	—	totals
	CO_2	+	—	+	—	+	—	+	—	
Result	*More* haematochrome with more nitrate	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No difference	0	0	0	0	2	2	5	4	13
	Less haematochrome with more nitrate	7	7	7	7	5	5	2	3	43

Table II.

Effect of CO_2 on haematochrome formation. The entries refer to numbers of comparisons of pairs of cultures differing in their treatment with respect to CO_2.

Condit.	Light	+	+	+	+	—	—	—	—	
	Acetate	+	+	—	—	+	+	—	—	totals
	Nitrate	+	—	+	—	+	—	+	—	
Result	*More* haematochrome with more CO_2	6	7	1	7	0	3	1	1	26
	No difference	1	0	2	0	6	4	6	5	24
	Less haematochrome with more CO_2	0	0	4	0	1	0	0	1	6

The suppressing action of nitrate is less pronounced in the dark than in the light, particularly in the absence of acetate. This, coupled with the fact that in the dark growth is always slower and indeed negligible in the

absence of acetate, provides indirect evidence of greater haematochrome suppression in more vigorously growing cultures.

The utilization of carbon dioxide in the light is seen to be correlated with enhanced haematochrome production. In the dark carbon dioxide was significantly without effect. Acetate, on the other hand, had a positive effect both in the light and in the dark, the difference in the two sets of figures being below the level of significance.

Table III.

Effect of CH_3COONa on haematochrome formation. The entries refer to numbers of comparisons of pairs of cultures differing in their treatment with respect to acetate.

Condit.	Light	+	+	+	+	—	—	—	—	
	CO_2	+	+	—	—	+	+	—	—	totals
	Nitrate	+	—	+	—	+	—	+	—	
Result	*More* haematochrome with more acetate	5	6	1	6	5	5	5	5	38
	No difference	2	1	2	1	2	2	2	2	14
	Less haematochrome with more acetate	0	0	4	0	0	0	0	0	4

Thus, both carbon dioxide and acetate increase haematochrome formation, the former only in the light, the latter in the dark also. In fact, haematochrome formation is increased when assimilable carbon is increased, and will occur also in the dark; which is in keeping with CHODAT's hypothesis.

Haematochrome Accumulation in Presence of Excess Nitrogen.

A further prediction can be made from the hypothesis, that if the carbon/nitrogen ratio is sufficient to account for all the facts, it should never be possible to obtain haematochrome formation in cultures when nitrogen is greatly in excess.

Fig. 1 represents the yields in two series of liquid soil extract cultures, at the onset of encystment. The cultures whose yields are given by curve A had no phosphate supplements, while those of curve B had them.

In series A, as nitrate was increased above a certain level, phosphate became limiting, so that further increases of nitrate produced no greater yield. In series B, yields were increased beyond this point by greater nitrate supplements. Nitrate must have been is excess in the phosphate limited cultures of series A, and yet all these showed greater haematochrome formation than did the equivalent cultures of the other series, which must by then have contained very much less nitrate.

Haematochrome formation also takes place in the presence of excess nitrate in cultures arrested by magnesium deficiency, or when growth is prevented by critical concentration of some poisons, such as 0.4% sodium chloride. Indeed, it has been found that, whenever growth is arrested by a cause other than carbon shortage, haematochrome accumulation becomes a possibility, irrespective of the amount of nitrogen present.

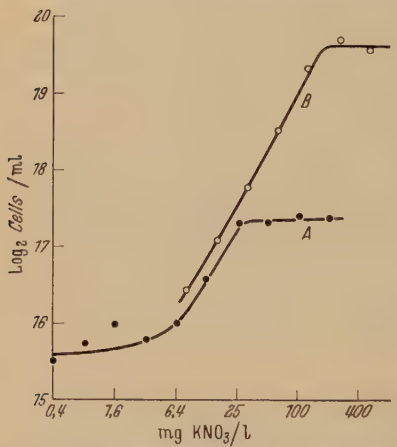


Fig. 1. Yields in liquid soil extract with increasing nitrate supplements: A, without additional K_2HPO_4. B, with 20 mg. K_2HPO_4/l.

Influence of Cell Division.

The relation of haematochrome formation to cell multiplication was studied by observing the growth cycle under different conditions, and recording the first appearance of the carotenoid. The curves in Fig. 2 represent the later stages of growth from single cells inoculated into liquid media consisting of soil extract with various additions.

A, B, and C had an initial concentration of 200 mg. KNO_3/l.; D, E, and F one of about 5 mg./l. (that being the amount contained in the soil extract). A, C, D, and F had, in addition, 500 mg. CH_3COONa/l.; C and F were grown in the dark. Growth was finally arrested by phosphate deficiency in A, B, and C and by nitrate deficiency in the remainder.

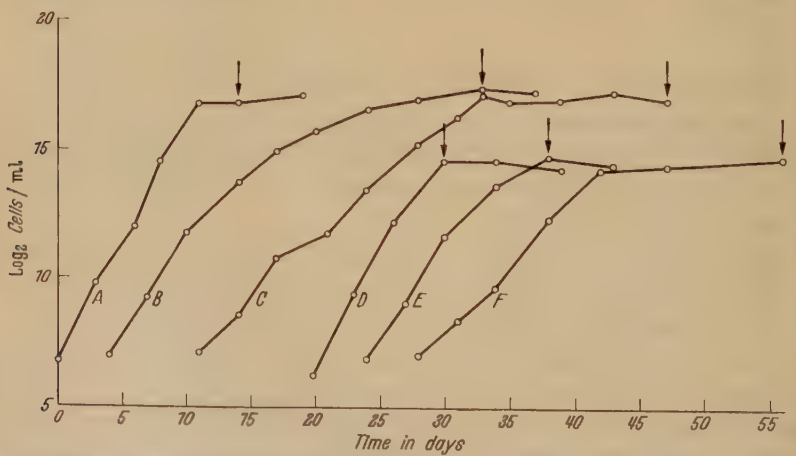


Fig. 2. Growth in liquid soil extract: supplements 200 mg. KNO_3/l., 500 mg. CH_3COONa/l. A, in light with KNO_3 and CH_3COONa; B, in light with KNO_3; C in dark with KNO_3, and CH_3COONa; D, in light with CH_3COONa; E, in light without supplements; F, in dark with CH_3COONa. The time when the carotenoid first became visible in the cells is indicated by an arrow. Note: placing of the curves on the time-scale is arbitrary.

The time at which haematochrome first became visible in the cells could be judged to within a day or two by microscopic examination. This time is indicated by arrows in the figure. It is seen that no haematochrome appeared before growth stopped, not even when conditions should have been most favourable, as in the culture with low nitrate, high acetate in the light (culture D). Afterwards, the actual time of appearance depended on the treatment, or more precisely, on the amount of carbon available at the time. Thus haematochrome was developed earliest when both organic and mineral carbon were available then (A and D), and later when one kind only could be used (organic carbon in C, and F), and later still when the sole source was in short supply (as with the carbon dioxide limitation of the growth rate in B).

Loss of Haematochrome.

Since haematochrome accumulation is not possible during continued cell-division it is not an unreasonable supposition that haematochrome loss may also be associated with these conditions. This is confirmed by many observations, a few of which will be mentioned.

When red resting cells are placed in a culture medium favourable for growth there is in most cases a considerable loss of haematochrome prior to germination, but no such loss occurs and, incidentally, no germination if the medium is deficient in any nutrient. For instance, the red colour of spores is maintained when they are placed in the dark in a fresh complete mineral medium but changes with accompanying germination in the same medium in the light.

The loss of haematochrome during cell-division can be observed by daily microscopic examination of cells from cultures enseminated with red spores (cf. Reichenow, 1909). Further, it has never been possible to demonstrate an increase in numbers in any population, whether natural or in culture, in which the amount of haematochrome was being maintained.

The following experiment shows that the loss during cell-division is not entirely due to the presence of an unavoidable excess of nitrogen. Red resting spores from a phosphate limiting medium (soil extract with 200 mg. CH_3COONa, 200 mg. KNO_3, and 20 mg. $MgSO_4$/l. yields about 2^{17} cells per ml.) were washed and placed in the following quantities into portions of the same medium freshly prepared, 2^{16}, 2^{15}, 2^{14}, 2^{13}, and 2^{12} cells per ml. The final yield of these cultures being of the same order, $2^{17 \pm 0 \cdot 3}$ indicates two, four, eight, sixteen and thirty-twofold increases in the successive cultures. By the time growth had ceased in each, all the cultures showed some colour change, but this was slight in the twofold culture, successively greater in the four and eightfold ones and complete in the remainder, thus indicating a complete loss of haematochrome in three generations of cell-division and, in spite of the presence of excess nitrogen, losses less complete when cell-division did not procede so far.

One can conclude, therefore, that haematochrome loss is indeed associated with conditions favourable for cell-division, and that, since some loss is observable in resting spores when about to germinate, haematochrome is mobilised during protein synthesis and not merely dissipated among the progeny of the dividing cell.

Discussion.

The foregoing experiments were chosen to illustrate the following points. First, the action of light and of carbon dioxide are dependent on one another, but that of organic carbon is independent of light; that is, haematochrome formation can occur in the dark. Second, haematochrome formation can be independent of the nitrogen, but not carbon, supply. Third, cell multiplication not only precludes accumulation but also is associated with loss of haematochrome.

The relation of carbon dioxide and organic carbon to light renders it almost certain that the very strong effect which the latter has is entirely through the photosynthetic apparatus, particularly since light in the red region appears to be the most effective. On the other hand, the presence of organic carbon enables the organism to by-pass photosynthesis, in respect no less to haematochrome formation than to growth. Haematochrome forms in the dark if organic carbon is available, but the rate of formation is less than in the light, just as it is with growth.

The effect of nitrogen is seen to be indirect. No haematochrome is formed while cell-division continues, while continued division is dependent on available nitrogen. However, under phototrophic conditions, there is a further factor: in media with high nitrogen, provided no other nutrient is limiting, cell-numbers are allowed to increase to such an extent that carbon dioxide becomes scarce, owing to its limited rate of diffusion. Then the delay in haematochrome formation is very great. This may be called a question of carbon/nitrogen balance; but if conditions are arranged so that continued cell-division depends on the supply of some other nutrient, the same considerations apply. One might say, for instance, that the carbon/phosphate balance is decisive.

A more general hypothesis can now be formulated, namely, that the accumulation of haematochrome is favoured by agents which prevent cell-division without impairing the plant's ability to assimilate carbon; and tends to be prevented by those which reduce the availability of the latter. These conclusions are in agreement with those reached by Garton, Goodwin & Lijinski (1951) with *Phycomyces*, which is interesting because in the fungus the carotenoid is β-carotene and not astaxanthine.

Conditions governing haematochrome accumulation and loss are those which in general govern accumulation and utilization of storage products, i. e. mobilisation during protein synthesis and accumulation in its absence.

So the relation between the carotenoid, starch and oil is of interest; but this has not been investigated in detail in *Haematococcus*. If behaviour is any indication of function, it appears — superficially, at any rate — that the carotenoid is itself a reserve substance in this alga, a conclusion reached by Senn (1911) concerning *Trentepohlia*.

It is well known that a discrepancy exists between the colour of motile populations in nature and the same in cultures; in the field *Haematococcus* is invariably red. The prediction that natural populations are probably numerically stable is borne out by cell counts. When a pool is flooded with rain water, the population maximum is very quickly reached, and thereafter maintained at this level during the life of the pool. Apparently, this is effected by a large reserve of resting spores, each of which is capable of germinating to give four motile cells. Preliminary biological assays using *H. pluvialis* suggest that nitrogen deficiency is not always the factor limiting these pool populations, phosphate and iron deficiencies having been recorded on occasions.

Summary.

Culture experiments with *Haematococcus pluvialis* show that carotenogenesis may be independent of available nitrogen but not of the carbon supply, and that cell multiplication not only precludes the accumulation of carotenoids even under conditions which are otherwise favourable to it, but also effects their disappearance. Chodat's hypothesis concerning the importance of the carbon/nitrogen balance has only limited application and is replaced by one of a more general nature.

Literature Cited.

Chodat, R., et F. Mayer: Sur les conditions de conformation de la carotine chez les algues en culture pure. C. R. Soc. Physique Genève **44**, 107 (1927). — Chodat, F.: Études sur la genèse des caroténoïds. Arch. des Sci. (Genève) **20**, 96 (1938). — Droop, M. R.: On the ecology of flagellates from some brackish and fresh water rock pools of Finland. Acta. Bot. Fennica **51**, 1 (1953). — Garton, G. A., T. W. Goodwin and W. Lijinski: Studies in carotenogenesis. I. General conditions governing β-carotene synthesis by the fungus Phycomyces blakesleanus Burgeff. Biochemic. J. **48**, 154 (1951). — Goodwin, T. W.: The comparative Biochemistry of the Carotenoids. London: Chapman & Hall Ltd. 1952. — Lwoff, M., et A. Lwoff: Détermination expérimentale de la synthèse massive de pigment caroténoïde par la flagellé Haematococcus pluvialis Flot. C. R. Soc. Biol. Paris **105**, 454 (1930). — Pringsheim, E. G.: Die Ernährung von Haematococcus pluvialis. Beitr. z. Biol. d. Pflanzen **12**, 413 (1914). — Reichenow, E.: Untersuchungen an Haematococcus pluvialis nebst Bemerkungen über andere Flagellaten. Kaiserl. Gesundh. Berlin **33**, 1 (1909). — Senn, G.: Physiologische Untersuchungen an Trentepohlia. Verh. schweiz. naturforsch. Ges. **94**, 281 (1911). — Tischer, J.: Über die Karotinoide von Haematococcus pluvialis. III. Z. physiol. Chem. **281**, 143 (1944).

M. R. Droop, Marine Station, Millport (Schottland).

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 398—403 (1954).

(From Institute of Microbiology, Uppsala 7, Sweden)

Studies on symbiotic nitrogen fixation by a new strain of tetraploid red clover (U036).

By

PER ERIC NILSSON and CONRAD RYDIN.

With 3 figures in the text.

(Eingegangen am 1. April 1954.)

Great variations appear in nitrogen-fixing ability of the symbiosis *Rhizobium-leguminous plant*. Of fundamental importance are the characteristics of the organisms involved. Different strains both of bacteria and of plants have been observed to involve characteristics stimulative or inhibitory for the development of optimal symbiotic activity.

This paper will deal with the symbiotic nitrogen-fixing ability of a new tetraploid red clover strain, described by ÅKERBERG (1953), which is of particular interest as a high quality example of tetraploid red clover strains recently developed in Sweden. As far as known today these new types of red clover are superior in many respects to the diploid strains. They are specially superior in resistance to wide-spread pathogens, BINGEFORS (1951), and they also have a higher nutritive value, KIVIMÄE (1951).

As *UO36* and other tetraploid strains will probably be in wide-spread practical use in the near future, it is of interest and value to know whether optimal nitrogen-fixing symbiosis will develop with the same strains of *Rhizobium* as found suitable for the diploid clover strains now cropped. If the symbiosis develops preferably and more effectively with other strains of bacteria this is of practical interest for the preparation of commercial cultures of legume-bacteria extensively used in this country.

Until recently the variations in nitrogen-fixing ability of the *Rhizobium-legume* symbiosis were considered mainly a result of differences between *Rhizobium* strains. By using the terms effective and ineffective strains of *Rhizobium* one indicates the limits of these variations. This side of the problem will be left without discussion and we refer to a review by ALLEN et al. (1950).

One has however also to take the plant factor into consideration. The plant can be responsible or unresponsible, using terms suggested by NUTMAN (1946), to the development of an effective symbiosis. Consequently the result is dependent upon an optimal combination of

effectivity of bacteria and responsibility of plant. The importance for the response in symbiosis of interaction between bacteria and host factors is shown by Nutman (1946) and Nutman and Read (1952). Vincent et al. (1953) found a certain specificity in choosing nodule-producing strains of *Rhizobium* between e.g. red and white clover. This did not correspond to a specific stimulative effect on the strains in the rhizosphere. Interesting discussions of these relationships are also given by Thornton (1947, 1949) and Jensen (1949).

Materials and methods.

The red clover strains investigated are *Ultuna* and *Merkur*, both diploid, and *UO36*, tetraploid.

Plants from these red clover strains were picked on field plots within the same area of a field experiment. The *Rhizobium* flora available for infection was therefore the same for all plants.

In connection with the isolation of *Rhizobium*, the number, size and distribution of nodules was observed. No differences appeared in distribution on root system and size of the nodules. *UO36* showed however a number of root nodules 20—25% higher than that of *Ultuna* and *Merkur*.

From each red clover strain 30 *Rhizobium* isolates were made from 10 plants by surface sterilizing the nodules and crushing them on an agar medium according to Allen (1949). Purity test on the isolated strains was made on a straw gelatine medium according to Bjälfve and Nilsson (1938) of the following composition: 5.0 g powdered wheat straw, 5.0 g sucrose, 0.2 g KNO_3, 1000 cc. tap water. After boiling (30 min) and filtration, 120 g of gelatine is added.

Aseptic plant cultures of *UO36* and *Ultuna* were cross-inoculated so that both clover strains were inoculated with all bacteria strains isolated. The plants were cultivated under aseptic conditions in common test tubes on agar slants, with a nitrogen-free salt combination according to Nutman (1946). Before seeding, the seeds were surface sterilized by treatment with concentrated H_2SO_4 for 20 min and washed several times. The effect of sterilization procedure was tested by plating the seeds on potato glucose agar for 48 hours at 28° C.

Two plants were allowed to develop in each tube. After planting the plant cultures were treated with the *Rhizobium* inoculums. Three tubes were treated with the same inoculum thus making six parallel clover plants from each *Rhizobium* isolated. Uninoculated plant cultures served as a control on sterility and also later as an analytical control on nitrogen-fixing activity.

All plant cultures were placed in green-house with artificial light. The nitrogen-fixing activity of the different symbioses was measured as increase in total nitrogen analysed according to Kjeldahl.

Results and discussion.

The nodulation was observed each day in the beginning of the nodulation period to determine when the first nodule developed. Later the nodules were counted every fifth day until the density of the root system made any accurate counting impossible. These nodulation studies are collected in figure 1.

The first nodules on *Ultuna* developed 9 days after inoculation and on *UO36* 11 days after inoculation. The nodulation on each of the parallel plants within the different series, after a short initial period, developed very similarly. So did also the plants themselves. There was a much higher nodulation activity on the *Ultuna* plants than on the *UO36* plants, throughout the cultivation period. The nodulation curve of *UO36* rose more slowly. When, because of the limited space in the cultivation vessel, cultivation had to be stopped, the curve was however still rising at the same speed. The nodule number on the original plants indicates that the *Ultuna* curve would later be overtaken. The longer nodulation period was not combined with an unfavourable distribution of the nodules over the root-system, often indicating a less active symbiosis.

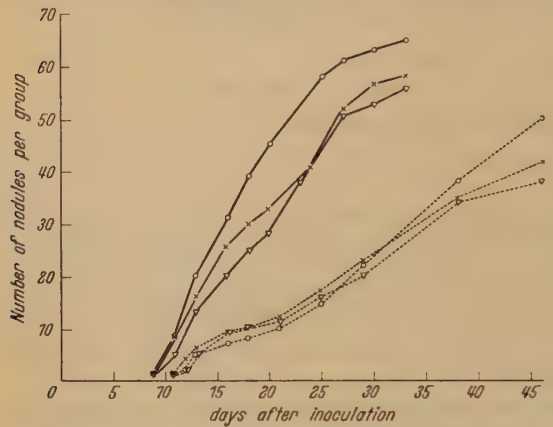


Figure 1. Nodule formation on *Ultuna* and *UO36* strains of red clover with *Rhizobium* strains of different origin.

o———o *Ultuna* plants inoculated with bacteria from *Merkur*.
×———× „ „ „ „ „ „ *UO36*.
▽———▽ „ „ „ „ „ „ *Ultuna*.
o---------o *UO36* plants, inoculated with bacteria from *Merkur*.
×---------× „ „ „ „ „ „ *UO36*.
▼---------▼ „ „ „ „ „ „ *Ultuna*.

The cross inoculations showed no marked differences in nodulation activity on the same clover strains, *Rhizobium* strains from *Merkur* giving rise to a somewhat greater number of nodules on the *Ultuna* clover strain than *Rhizobium* strain isolated from the other clover strains in the experiment.

The plants cross-inoculated with the isolates of different origin also developed uninfluenced by possible variations in the inoculum. During the early stage the *UO36* plants were the biggest, which can still be seen on plants 35 days of age (Figure 2), inoculated with the same bacteria strain.

After two months the *Ultuna* plants however had a greater mass than the *UO36* plants, which, as will be shown, corresponded to a similar rise in nitrogen content. These changes in vegetative activity may be due to a severer depression of *Ultuna* than of *UO36* in the initial stage of infection, as a result of the greater amount of reserve nutrients available

for the *UO36* plants. The seed of *UO36* has a much greater volume than that of *Ultuna*, and determination of their total nitrogen content showed a mean content of 0.19 mg compared to 0.10 mg in *Ultuna* seed.

The plant cultures were harvested 3 months of age. The cultivation method did not allow further development of the plants. Total nitrogen was determined from the whole content of the cultivation tubes. Uninoculated plant cultures served as analytical controls. Each group of six plants in three tubes was made up to one sample. The results of the analyses are shown in tables 1 and 2.

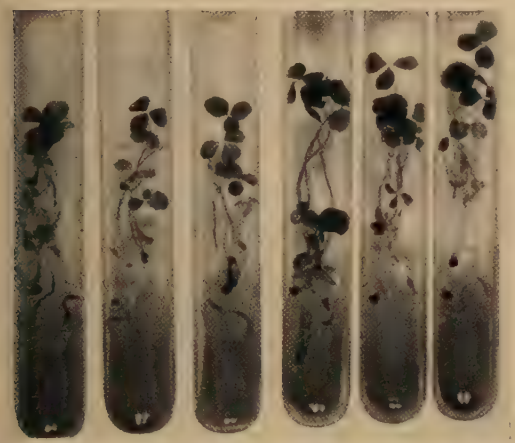


Figure 2. Development of the *Ultuna* and *UO36* strains at 35 days of age.

UO36 and *Ultuna* in symbioses with *Rhizobium* strains of different origin showed no significant differences in total nitrogen content. No sign of specific selection of *Rhizobium* strain appeared in the nitrogen-fixing activity according to the experimental technique used. The *Rhizobium* strains originally infecting all clover strains in the experiments originated from the same mixed soil microflora. All isolated strains but one gave rise to symbioses with *UO36* and *Ultuna* of the same nitrogen-fixing activity.

Table 1. *Symbiotically fixed nitrogen by UO36 red clover plants and Rhizobium strains of different origin.*
Mg N per 2 × 3 plants.

Group of plants	Origin of inoculum		
	Ultuna	*Merkur*	*UO36*
1	3.7	3.2	3.6
2	4.3	3.7	4.4
3	5.1	3.6	2.9
4	3.2	3.7	3.6
5	4.1	4.0	3.8
6	4.4	3.1	4.5
7	3.7	2.0	4.0
8	—	3.4	4.0
Sum	28.5	26.8	30.7
Per group	4.1	3.3	3.8

Table 2. *Symbiotically fixed nitrogen by Ultuna red clover plants and Rhizobium strains of different origin.*
Mg N per 2 × 3 plants.

Group of plants	Origin of inoculum		
	Ultuna	*Merkur*	*UO 36*
1	6.5	7.8	6.0
2	7.4	6.4	6.5
3	6.4	6.5	5.2
4	5.9	6.4	6.6
5	—	6.8	5.7
6	—	7.2	6.7
7	—	6.5	5.6
8	—	6.8	6.8
9	—	—	6.7
Sum	26.2	54.2	55.9
Per group	6.6	6.8	6.2

In one case an ineffective symbiosis was developed between *Ultuna* plants and one *Rhizobium* strain isolated from an *Ultuna* plant. Twice as many nodules were developed in this plant culture as in other cultures in the series. The nodules developed normally but no nitrogen was fixed (see fig. 3). In this case the failure of the symbiosis seems to be due to an ineffective *Rhizobium* strain, not to unresponsible plants, as both plants in the culture tube developed an ineffective symbiosis.



Figure 3. Development of ineffective symbiosis on *Ultuna* strain. O: uninoculated; A: ineffective; B: effective.

The nitrogen analyses showed a higher nitrogen content in the *Ultuna* plants than in the *UO36* plants. This agrees badly with investigations on the nutritive value of the two strains carried out by Kivimäe (1950) showing a higher protein content of *UO36* than of *Ultuna*. Now the analysis in the present investigation is made at a much earlier stage and with an experimental technique not suitable for quantitative work of such type. The differences might, however, just because the special conditions in the present experiments, indicate a lower responsibility to symbiotic activity of *UO36*, which was not found under field conditions. In the field there are other nitrogen sources than the symbiotically fixed that can be used, which however is not the case in the aseptic cultures

of the present experiments. Just the fact that the tetraploid strain, because of its bigger seed, has so much more nutrient available, specially nitrogen, might delay the development of the symbiosis, more unfavourable in a cultivation entirely dependent upon fixed atmospheric nitrogen. The highly important question whether tetraploid strains of red clover — in this case specially the strain *UO36* — represent an improvement in protein-synthesizing efficiency using atmospheric nitrogen thus needs more detailed investigations to be answered.

Inoculation practice will — as far as can be judged from strain *UO36* — evidently not be influenced by cropping tetraploid red clover instead of diploid strains. Strains of *Rhizobium* now used in commercial cultures and found effective in connection with diploid strains will probably be effective also when cropping tetraploid strains.

Summary.

Some characteristics of the symbiotic nitrogen fixation by tetraploid red clover (*UO36*) have been studied in laboratory experiments. Cross-inoculations were made on tetraploid and diploid clover plants using *Rhizobium* isolates from both types of clover. Nodulation activity and nitrogen fixation were determined. No sign of specific strains necessary for optimal fixation of nitrogen by the *UO36*-symbiosis was observed in comparison to the diploid clover strain. *Rhizobium* cultures effective in connection with cultivation of diploid clover will probably also be effective when cultivating tetraploid clover strains.

This work has been supported by grants from Kungl. Lantbruksakademien. The authors wish to express their thanks to Mr. S. Bingefors, Agr. Lic., for his contribution to this investigation by producing the seed of the tetraploid red clover (*UO36*).

Literature.

Allen, E. K., and O. N. Allen: Bacter. Rev. **14**, 273 (1950). — Åkerberg, E.: Lantbruksveckans Handlingar 1953. — Bingefors, S.: Beten, Vallar och Mossar **3**, 53 (1951). — Försök och undervisning 1951. — Bjälfve, G., and R. Nilsson: Ann. Roy. Agr. Coll. Sweden. Vol. **5**, 71 (1938). — Jensen, H. L.: Tidskrift for Planteavl **52**, 653 (1950). — Kivimäe, A.: Sveriges Utsädesförenings Tidskrift **1**, 13 (1951). — Nutman, P. S.: Nature **157**, 463 (1946). — Nutman, P. S., and M. P. Read: Plant and soil **4**, 57 (1952). — Thornton, H. G.: Antonie van Leeuwenhoek **12**, 85 (1947). — Agr. Progress **24**, 102 (1949). — Vincent, J. M., and C. M. Waters: J. Gen. Microbiol. **9**, 357 (1953). —

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 404—409 (1954).

(From Institute of Microbiology, Uppsala 7, Sweden
and Department of Medical Biochemistry, Medical University of Gothenburg.)

Amino acid content of leguminous proteins as affected by genetic and nutritional factors. I.

By

PER ERIC NILSSON, KRISTOFFER KORSAN-BENGTSEN and OLOF MELLANDER.

(Eingegangen am 1. April 1954.)

The very big difference in production capacity and cost between vegetable and animal protein makes the production of vegetable proteins of comparable nutritional value very important from both the economic and the nutritional point of view.

Leguminous crops are our most important source of vegetable protein. They have the unique characteristic of being able to synthesize their protein on the basis of atmospheric nitrogen, fixed in symbiosis with *Rhizobium*. This economically very important characteristic is made extensive use of through artificial inoculation with *Rhizobium* cultures to ascertain optimal development of the symbiosis.

The composition of the proteins in different leguminous plants has been studied by several workers. A review of investigations dealing with the proteins in soya-bean, clover, alfalfa and other crops has been made by LUGG (1949).

ÅGREN (1949, 1951, 1952) has determined by microbiological methods the amino acid content in different foodstuffs, among them red clover, lupin meal and soya-bean meal. The methionine range in 100 selections of alfalfa has been determined by SINGLETON, MERTZ and DAVIES (1952) by microbiological methods, using an improved hydrolyzing technique. The variations in methionine content were small.

DANIELSSON and LIS (1952) have made comparisons between the amino acid content of different pea proteins, both globulins and albumins. They found that the albumin fraction investigated had a higher content of lysine, an essential amino acid, than usually found in vegetable proteins.

Recently FLODIN (1953) in an interesting review of the nutritive value and availability of food proteins gave the proportionality factors for essential amino acids in such proteins. He reached the general conclusion that there is a marked shortage of lysine, methionine, threonine and tryptophane in human dietaries. Among the leguminous products soya-bean meal is best, showing only slight deficiency of methionine, peas and beans having a great deficiency of tryptophane and methionine and a slight one of lysine. The proportionality factors were calculated on analytical data compiled by BLOCK and BOLLING (1951).

It seems to the present authors important to investigate how cultivation practice can influence upon the protein composition of the crop. The intention of our work is to investigate the composition of proteins from different leguminous plants and different strains of the same plant

type, genetically different, grown under different nutritional conditions. The present paper gives some results from studies of tetraploid and diploid red clover and from red clover and peas fed with nitrogen symbiotically fixed and nitrogen taken up as nitrate. Some characteristics of the nitrogen-fixing symbioses of the same tetraploid and diploid red clover strains have been studied by NILSSON and RYDIN (1954).

Plant material: Tetraploid red clover, *UO36*. Diploid red clover, *Ultuna*. Yellow peas, *Gyllen*.

The plants were cultivated under bacteriologically controlled conditions in glazed fireclay pots of 2 litres volume. The pots were filled with sand and autoclaved at 120° C for $1^1/_2$ hours. After seeding with surface sterilized seed, an one-inch layer of white quartz sand 2—4 mm was placed on top of the sand. By keeping this top layer dry, any contamination of the root zone by airborne micro-organisms was made very difficult. Consequently the nutrient solution was poured into the pot and kept at a constant level through a glass tube direct to the bottom. A salt combination according to NUTMAN (1946) was used throughout the experiments:

KH_2PO_4	0,05%	$Ca_3(PO_4)_2$	0.2%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02%	$FePO_4$	0.1%
NaCl	0.01%	$FeCl_3$	0.001%

For the nitrate series, 0.25% $Ca(NO_3)_2$ was added to this formula.

The media were autoclaved at 120° C for 20 min.

The clover seeds were surface sterilized by treatment with concentrated H_2SO_4 for 20 min and then washed in sterile water several times. This method was not suitable for the peas and therefore these were sterilized by combined treatment with mercury chloride and ethylalcohol, according to ALLEN (1949). After sterilization, seeds of all types were plated on potato glucose agar until germinated (3 days), to get a check of the effect of the sterilization procedure.

When seeding the pots without nitrogen, the seed was inoculated with *Rhizobium* by shaking in a bacteria suspension.

For analysis of very young material, clover was grown on agar in common test tubes, the same nutrient solution as above being used.

All plant cultures were placed in a greenhouse with artificial light.

After 4 weeks a marked effect of nitrogen fixation on colour and size of the plants was observed. The youngest material (young plants) was harvested soon after the true leaves began to develop and a marked effect of the nitrogen fixation appeared, compared to uninoculated plants without nitrogen. The older material (blooming plants) was harvested in the blooming stage. Some pea plants were allowed to ripen.

The following procedure was used in the analytical work:

The plant material was dried in air. Pea material was divided into stalks, leaves, roots and fruits (pea + pod), the clover material into stalks + leaves and roots. 1 gm of the material and 20—30 ml 80% ethanol was homogenized in a blender or was disintegrated by hand. After two hours the mixture was centrifuged and the alcohol decanted. The alcohol treatment and centrifugation were repeated once. The treated plant material was dried to constant weight, and 0.05 gm was used for the hydrolyses. The hydrolyses were carried out in 6 n HCl at 150° C for 24 hours.

After this time there was still an unhydrolysed dark-coloured fraction containing a very small amount of nitrogen (see Table 1). No amino acids were found in this fraction by paper chromatography, however, after repeated hydrolyses.

Table 1. *Nitrogen content of the unhydrolysable fractions from ripe pea-materials.*

Plant material	mg nitrogen	
	Total in the sample (0.05 gm)	In the unhydrolysable fraction
Inoculated:		
fruits	1.2	0.06
stalks	0.7	0.07
leaves	1.8	0.08
roots	1.4	0.08
Uninoculated:		
fruits	1.3	0.03
stalks	0.4	0.04
leaves	1.0	0.04
roots	1.2	0.06

The hydrolysates were evaporated on a water bath. The evaporation residue was dissolved in distilled water and re-evaporated. After redissolution it was desalted and evaporated to dryness. To the hydrolysate with the lowest nitrogen content 1 ml of distilled water was added, to the others the amount of water necessary to give the same nitrogen concentration. From the dilutions 0.1 ml was taken by a calibrated pipette to the chromatograms.

Munktell OB paper was used for the chromatograms. Two-dimensional chromatography was used. For the first direction (ascending) a water-saturated phenol + 0.1% cupron was used for 20 hours at 26° C in ammonia-atmosphere. After drying the papers, pyridine-amylalcohol-water (35—35—30) was applied (descending). The papers were sprayed with 0.1% ninhydrine and the spots were observed after 24 hours.

Determinations of total nitrogen were made on all plant material by means of Kjeldahl's method. The percentage of total nitrogen found is given in Table 2. As is shown in this table, the nitrogen content in the inoculated series was much higher throughout the experiments. This was particularly pronounced in the leaves. The total amount of nitrogen per plant or pot was however not determined. Neither was the supply of nitrate continually observed.

Tables 3 and 4 show the findings from the paper chromatograms.

As the material grew older the analyses of inoculated material showed much more intense amino acid reaction than the nitrate-fed material.

In the clover series there was a higher amino acid content in leaves than in roots. The pea plants had about the same amino acid composition in roots, leaves and seed.

An interesting difference between the diploid *Ultuna* and the tetraploid *U036* red clover is to be found in arginine. The diploid strain contains no arginine. In the tetraploid, however, there was a clear indication of this amino acid.

Table 2. *Total nitrogen content in plant material dried and extracted with ethanol.*

Plant material	Percentage total nitrogen	
	Inoculated	Nitrated
Peas (Gyllen):		
stalks	1.37	0.84
leaves	3.66	2.04
roots	2.90	2.45
fruits	2.46	2.46
Red clover:		
U036, young plants		
leaves	4,30	3,67
roots	1.94	1.46
U036, blooming plants		
leaves	3,43	1.92
roots	2,67	1.69
Ultuna, blooming plants		
leaves	3.71	1.82
roots	2.51	1.62

The presence of arginine in this new red clover strain is interesting, especially as, according to KIVIMÄE (1951), this strain has also shown a higher feeding value than the older diploid strains in other connections. Our analysis however indicate a much lower concentration of arginine than that in e. g. peas. A search for a protein better in this respect might be successful among the breeding material used for developing the strain *U036*.

Some amino acids show decreasing tendency or total disappearance with increasing age of plant, according to the analyses on protein from *U036* red clover of different ages. The analyses were made only at two stages of development. Better information on changes in protein composition during the plant development could be of practical value for food production. Such information, together with variations in the amino acid pattern is fundamental for the value of a new legume crop and consequently highly important factors in plant breeding work.

The different nitrogen source did not affect the protein synthesis qualitatively, as far as can be judged from amino acid analyses. Hydrolysates from material with biologically fixed nitrogen did however contain amino acids in a higher concentration than the other series.

Table 3. *Amino acid composition of protein from different pea material.*

Plant material	Inoculation	Cyst.[1]	Asp.	Glut.	Ser.[1]	Glyc.	Thre.[1]	Alan.	Hydr. prol.	Hist.	Lys.	Arg.	Prol.	Val.	Meth.[1]	Phen. alan.	Leuc. Isoleuc.	Tyros.
Pea:																		
roots . .	+	—	+++	+++	—	+++	—	+++	+	+	++	++	+	++	—	++	++	+
roots . .	—	—	++	+++	—	+++	—	+++	+	+	++	++	+	+++	—	+++	+++	+
stalks . .	+	—	+++	+++	—	+++	—	+++	+	+	++	++	++	+++	—	+++	+++	+
stalks . .	—	—	+++	+++	—	++	—	++	trace	++	+	+	+	++	—	++	++	trace
leaves . .	+	—	+++	+++	—	+++	—	+++	—	+	++	++	+	+++	—	+++	+++	+
leaves . .	—	—	++	+	—	++	—	++	—	trace	+	+	trace	++	—	++	++	trace
fruits . .	+	—	++	++	—	+++	—	+++	—	trace	++	++	+	++	—	++	++	trace
fruits . .	—	—	+++	+++	—	++	—	+++	—	trace	++	++	+	+++	—	+++	+++	trace

[1] Cyst., ser., thre., and meth. probably destroyed during the hydrolysis. In quantitative analysis of the red clover material on Dowex 50 serine and threonine are present. These experiments will be published later.

Table 4. *Amino acid composition of protein from different red clover material.*

Plant material	Inoculation	Cyst.	Asp.	Glut.	Ser.	Glyc.	Thre.	Alan.	Hist.	Lys.	Arg.	Prol.	Val.	Meth.	Phen. alan.	Leuc. Isoleuc.	Tyros.
Ultuna (blooming plants):																	
roots	+	—	++	++	—	++	—	++	+	+	—	+	++	—	++	++	trace
roots	—	—	+	+	—	+	—	+	trace	trace	—	—	+	—	+	+	trace
leaves + stalks	+	—	++	+++	—	++	—	++	+	++	—	+	+++	—	+++	+++	+
leaves + stalks	—	—	+	++	—	++	—	+	trace	++	—	+	++	—	++	++	trace
U036 (blooming plants):																	
roots	+	—	++	+++	—	++	—	+	trace	+	+	+	++	—	++	++	trace
roots	—	—	—	++	—	+	—	+	trace	trace	trace	trace	+	—	+	+	trace
leaves + stalks	+	—	+++	+++	—	+++	—	+	+	++	++	+	+++	—	+++	+++	+
leaves + stalks	—	—	+	++	—	+	—	+	trace	trace	—	trace	++	—	++	++	trace
U036 (young plants):																	
roots	+	—	++	++	++	++	—	++	trace	trace	trace	—	+	—	+	+	—
roots	—	—	+	+	+	+	—	+	trace	—	—	—	+	—	+	+	—
leaves + stalks	+	—	+++	+++	+++	+++	—	+++	trace	+	trace	trace	++	—	++	++	—

Summary.

Tetraploid and diploid red clover have been cultivated in greenhouse under aseptic conditions. The plant cultures were given only one source of nitrogen: either they were given nitrate in the nutrient solution or they were inoculated with *Rhizobium* for establishing symbiotic fixation.

The amino acid composition of protein from the different series and from different parts of the plants was analysed by paper chromatography.

There was a clear arginine reaction from the tetraploid clover material but no arginine at all was found in the diploid clover material.

Plants fed on nitrate and those fed on symbiotically fixed nitrogen showed the same amino acid pattern as far as can be judged from the chromatograms. The hydrolysates from inoculated plants showed usually more intense ninhydrine reaction on the chromatograms than hydrolysates from not inoculated plants, although diluted to the same nitrogen content. For this fact we have so far no explanation.

The authors wish to express their thanks to Mr. S. Bingefors, Agr. lic., Sveriges Utsädesförening, Ultuna, for his contribution to this investigation by producing the seed of the new tetraploid red clover *U036*.

Literature.

Allen, O. N.: Experiments in soil bacteriology. Minneapolis: Burgess Publishing Co. 1949. — Block, R. J., and D. Bolling: Amino acid composition of proteins and foods. 2nd ed. Springfield, Ill.: Thomas 1951. — Danielsson, C. E., and H. Lis: Acta chem. scand. (Copenh.) **6**, 139 (1952). — Flodin, N. W.: Agr. and Food Chem. **1**, 222 (1953). — Kivimäe, A.: Sveriges Utsädesförenings Tidskrift **61**, 13 (1951). — Lugg, J. W. H.: Advances in Protein Chemistry **5**, 229 (1949). — Nilsson, P. E., and C. Rydin: Arch. Mikrobiol. **20**, 398 (1954). — Nutman, P. S.: J. Bacter. **51**, 411 (1946). — Singleton, V. L., E. T. Mertz and R. L. Davis: Agronomy J. **44**, 346 (1952). — Ågren, G.: Acta chem. scand. (Copenh.) **3**, 931 (1949); **5**, 766 (1951); **6**, 608 (1952).

After preparation of the manuscript certain results from amino acid analyses on corn were published by Sauberlich, Chang and Salmon (Journal of Nutrition Vol. 51, 1953, pp. 241—250). As their paper also deals with the influence of variety and fertilization on the amino acid content of a crop, we want to direct the attention of the reader also to that paper.

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 410—422 (1954).

(Aus der Kohlenstoffbiologischen Forschungsstation e. V., Essen.)

Ein Beitrag zur Wirkung diskontinuierlicher Belichtung auf die Massen- und Individuenvermehrung von Chlorella vulgaris.

Von

MARIA-ELISABETH MEFFERT.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. April 1954.)

Bei der Beobachtung von Algenkulturen, die einem regelmäßigen Licht-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt waren, beobachtete v. DENFFER (1949) an *Nitzschia palea* eine durch den Licht-Dunkel-Wechsel steuerbare Individuenvermehrung, wobei neue Teilungen nur in der Lichtphase eingeleitet werden. GERDES (1951) stellte bei Versuchen mit *Scenedesmus bijugatus* fest, daß bei bestimmtem Licht-Dunkel-Wechsel verschiedener Rhythmen die Zunahme der Zellenzahl entweder auf die Dunkelphase oder auf den Beginn der Lichtphase beschränkt war. Also auch hier wurde durch den Licht-Dunkel-Wechsel den Zellen eine ganz bestimmte Teilungsrhythmik aufgeprägt. Auch AACH (1952) fand bei diskontinuierlich belichteten Kulturen von *Chlorella pyrenoidosa*, daß die Zellteilungen simultan zu ganz bestimmten Zeiten — kurz nach Beginn der Lichtperiode — stattfanden. TAMIYA u. Mitarb. machten dieselben Beobachtungen bei *Chlorella ellipsoidea* (1953, Mitteilung). Die Autoren zeigen dabei die Beziehungen zwischen Photosynthese und lichtunabhängigen Stoffwechselvorgängen und klären damit gleichzeitig das Auftreten bestimmter Zelltypen im Entwicklungscyclus der genannten Alge.

Da bei eigenen Versuchen ebenfalls sowohl bei natürlich wie auch bei künstlich diskontinuierlich belichteten Algenkulturen immer wieder auffiel, daß die Aplanosporenbildung und der Massenzuwachs der Einzelzelle offensichtlich in einem bestimmten Rhythmus abliefen, interessierte es, diese Vorgänge zu verfolgen. Es wurden daher Versuche angesetzt, über deren Ergebnisse im folgenden berichtet wird.

Zur Methodik.

Versuchsalgen. Die Versuche wurden mit 2 Serien angesetzt, wovon eine, Serie a, im Licht-Dunkel-Rhythmus von 14 : 10 Std belichtet wurde (Abb. 1, 3, 5, 7) und die andere, Serie b, Dauerlicht erhielt (Abb. 2, 4, 6, 8). Jede Serie bestand aus 3 Parallelen. Das Impfmaterial für beide Serien — eine Suspension eines Stammes

von *Chlorella vulgaris*[1] — war ebenfalls im Licht-Dunkel-Wechsel von 14 : 10 Std kultiviert worden, da gleichzeitig geprüft werden sollte, ob der durch den Licht-Dunkel-Wechsel induzierte Rhythmus der Individuen- und Massenvermehrung auch bei der Kultur im Dauerlicht erhalten blieb. Alle Kulturen hatten eine anfängliche Zellkonzentration von $0{,}1 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

Kulturgefäße und Nährlösung. Die Suspensionen — 200 ml — wurden in 300 ml fassende Jenaer Erlenmeyer-Kolben (Glassorte 20) kultiviert, die mit 2fach durchbohrten Gummistopfen verschlossen waren. Die beiden Bohrungen enthielten das Gaseinleitungs- und Ausführungsrohr. Die verwendete Nährlösung setzte sich wie folgt zusammen: 1000 ml enthärtetes, steriles Leitungswasser, 3,42 g KNO_3; 0,54 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$; 0,84 g KH_2PO_4; Spurenelemente in mg/l: 2,86 H_3BO_3; 1,81 $MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$; 0,222 $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$; 0,079 $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$; 0,015 MoO_3; 4,3 $CaSO_4$ (modifiziert nach Arnon [1938]); 1 mg Eisenzitrat; 1 mg Citronensäure (Rohde [1948]).

Durchlüftung. In die Kulturen wurde ständig ein Gasgemisch, das neben 95 Vol% Luft 5 Vol% CO_2 enthielt, eingeleitet. Der Gasdurchgang betrug etwa 40 l/h.

Belichtung und Temperatur. Als Lichtquelle dienten Leuchtstoffröhren (Osram HNG, 40 Watt). Die Entfernung zwischen Leuchtstoffröhren und Kulturen betrug 5 cm. Daher ergab sich für die Kulturen eine Beleuchtungsstärke von 2700 Lux. Die intermittierend belichtete Serie wurde von 22.00 bis 8.00 Uhr verdunkelt. Die Temperatur wurde auf $25 \pm 2°$ C einreguliert.

In den ersten 4 Tagen wurden um 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00 und 22.00 Uhr Proben für die Bestimmung der Zellkonzentration, des Anteils der Teilungsstadien, der freien Tochterzellen und der Zellgröße entnommen. Vom 5. Tag an wurde die Probeentnahme auf 8.00 und 20.00 Uhr beschränkt.

Die Zellkonzentration wurde zu allen genannten Zeiten mit Hilfe der Zählkammer nach Thoma bestimmt. Dabei wurden die Angaben von Janke (1946) und Müller (1924) beachtet. Es wurden von jeder Kultur 3 Tropfen ausgezählt, der Mittelwert wurde also von 9 Einzelwerten bestimmt. Die mittlere Abweichung des Mittelwertes ($\sigma\,\bar{x}$) betrug bei

Zellkonzentrationen von $0{,}1$—$0{,}3 \cdot 10^6$ Zellen/ml etwa 10%,
„ $0{,}3$—$7{,}0 \cdot 10^6$ „ „ 5%,
„ ab $7{,}0 \cdot 10^6$ „ „ 1—3%.

Diesen Werten entsprach eine mittlere Abweichung des Einzelwertes vom Mittelwert von 25—30%, 10—20%, < 10%. Die Berechnung des Sicherheitskoeffizienten $t = \frac{x}{\sigma\bar{x}}$ ergab in allen Fällen Werte > 3.

Als Teilungsstadien wurden alle Zellen bezeichnet, die deutlich die Bildung von Tochterzellen durch Anlage von Zellwänden erkennen ließen. Es dürfte sich bei diesen Stadien vermutlich um die Telophase gehandelt haben. Aplanosporen sind in jungen, diskontinuierlich belichteten Kulturen, in denen die Tochterzellen kurz vor oder während der Dunkelphase frei werden, an der geringen Größe, der blassen Farbe und der häufig elliptischen Form gut von anderen Zellen zu unterscheiden. In kontinuierlich belichteten Kulturen nehmen die Zellen dagegen bald an Volumen zu. Auch der Chlorophyllgehalt ist hier offensichtlich größer. Die Sporen sind daher

[1] Herr Prof. Pringsheim war so freundlich, die Alge zu bestimmen. Für sein Entgegenkommen sagen wir auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank.

als solche schwerer und auch nur kürzere Zeit erkennbar. Daher dürften die Werte, die in der Abb. 6 angegeben werden, wohl durchweg zu niedrig liegen. Auf eine Wiedergabe wurde trotzdem nicht verzichtet, da auch diese Daten deutlich rhythmische Schwankungen zeigen.

Zur Ermittlung der Zellgröße wurden die Zellen mit Hilfe des Abbeschen Zeichenapparates gezeichnet und ausgemessen. Zu Beginn des Versuchs — bei der noch geringen Zellkonzentration — wurden jeweils mindestens 50 Zellen, bei steigender Zelldichte mindestens 100 Zellen gezeichnet und gemessen. Da keine Möglichkeit bestand, die Zellmasse je Volumeneinheit exakt zu messen, wurde sie gemäß der Formel $\frac{4}{3}\pi r^3 \cdot n$ (n = Zellkonzentration/ml) berechnet (Bristol Roach, 1926). Diese Methode hat den Nachteil, daß der Fehler der Größenmessung ebenfalls in die 3. Potenz erhoben wird (Pearsall u. Loose, 1937). Die mittlere Abweichung des Mittelwertes ($\sigma\bar{x}$) lag hier zwischen 1—5%, d. h. daß der Sicherheitskoeffizient den Wert 3 weit überschritt und daß ferner die berechnete Abweichung ausgedrückt in μ mit der verwendeten Optik nicht mehr zu erkennen ist. (5% Fehler bei einem Zelldurchmesser von 8 μ sind 0,40 μ; während ein Abstand von 0,43 μ noch eben wahrnehmbar ist. Die mittleren Zelldurchmesser lagen aber selten über 8 μ.)

Ergebnisse.

Die Abb. 1–8 (S. 416/417) bringen die Ergebnisse unserer Versuche.

Zellvolumen.

Im Verlaufe einer Kultur verändert sich das Zellvolumen recht augenfällig. So beobachtet man allgemein in jungen Kulturen mit geringen Zellkonzentrationen recht große Zellen im Verhältnis zu denen der Ausgangskultur. Mit zunehmender Zellmasse, d. h. mit abnehmender Lichtintensität, nimmt dann auch die Zellgröße ab (Myers, 1946). Aber auch innerhalb von 24 Std findet man bei diskontinuierlich belichteten Kulturen recht erhebliche Größenschwankungen (siehe Abb. 1). So nimmt hier das Volumen der Einzelzelle regelmäßig während der Lichtphase zu, erreicht um 22.00 Uhr — beim Einsetzen der Dunkelperiode — die höchsten Werte, um dann bis zum Beginn der Belichtung um 8.00 Uhr ständig abzunehmen. Aber auch bei der kontinuierlich belichteten Serie ist ein Rhythmus der Volumenzu- und -abnahme deutlich erkennbar, der während der ersten 2 Versuchstage mit dem der Serie a genau übereinstimmt, während am 3. Versuchstag hier das Zellvolumen um 16.00 Uhr und am 4. Versuchstag um 12.00 Uhr den maximalen Wert erreicht (Abb. 2). Es ist ferner auffallend, daß bei beiden Serien mit fortschreitender Kulturdauer die Maxima der Zellvolumen abnehmen, bis am 6. Versuchstag beim Erreichen des anfänglichen Wertes der Rhythmus bei beiden Serien ausklingt.

Diese Beobachtungen sind ausführlich in Tab. 1 (S. 414/415) dargestellt. Angegeben ist die prozentuale Verteilung der Zellgrößen, wobei unter Zellgröße der mittlere Zelldurchmesser am Ende der Licht- und der Dunkelperiode verstanden wird. Zu diesen beiden Zeiten lagen ganz

verschiedene Entwicklungsstadien in der Suspension vor, die auch an der Zellgröße erkennbar waren. So liegt das Maximum des Zelldurchmessers bei Serie a gegen Ende der Dunkelperiode zwischen 5—7 μ, während der Lichtperiode nimmt das Zellvolumen zu, so daß zu Beginn der Dunkelphase der mittlere Zelldurchmesser etwa 1—2 μ größer ist als am Morgen. Dieselben Größenverschiebungen sind bei den kontinuierlich belichteten Kulturen zu beobachten.

Die Daten zeigen weiter, daß die Zellgrößen zwischen 3 und 12 μ variieren, daß der größte Prozentsatz der Zellen aber einen Durchmesser von 5—8 μ oder 4—7 μ aufweist.

Teilungsstadien und Sporen.

Die beschriebenen rhythmischen Veränderungen der Zellgrößen werden durch 2 eng zusammenhängende Stoffwechselprozesse verursacht. In der Lichtperiode führt die Synthese von organischem Material zur Vergrößerung der Zellen und schließlich — bei Erreichung eines bestimmten Reifegrades — zur Anlage von Aplanosporen. Dieser zuletzt genannte Vorgang dürfte aber unabhängig von der Lichtzufuhr sein, wie auch das Freiwerden der Sporen, das bei diskontinuierlich belichteten Kulturen meist in der Dunkelphase vor sich geht (v. Denffer, 1949; Gerdes, 1951; Tamiya, 1953, Mitteilung). Bei dem hier geschilderten Versuch wurde in der Serie a der höchste Prozentsatz an Teilungsstadien gegen Ende der Lichtperiode festgestellt (siehe Abb. 3), also zur gleichen Zeit, in der auch die größten Zelldurchmesser ermittelt und keine freien Sporen gefunden wurden. 4 Std später wurden bereits die ersten freien Sporen gezählt, deren Prozentsatz nach weiteren 4—6 Std gegen Ende der Dunkelperiode den Höhepunkt erreichte[1], während jetzt der Anteil an Teilungsstadien außerordentlich gering war. Die gleichzeitige Bestimmung der Zellgröße ergab jetzt sehr niedrige Werte. Im Verlauf der um 8.00 Uhr einsetzenden Lichtphase nahmen die jungen, noch kleinen Zellen an Masse und Volumen erheblich zu, wobei der anfänglich zarte, hyaline Zellinhalt kompakt und dicht wurde. Um 20.00 Uhr war bereits wieder der größte Teil der Zellen in Teilung. Dieser Rhythmus, in dem die Massen- und die Individuenvermehrung praktisch aller Zellen streng getrennt voneinander vor sich geht, wobei die Maxima der Teilungsstadien und der freien Aplanosporen immer zur gleichen Zeit auftreten, dauerte bis zum 5. Versuchstag an.

In der kontinuierlich belichteten Serie b findet man ebenfalls in den Abendstunden den höchsten Prozentsatz an Teilungsstadien (Abb. 4).

[1] Daß der maximale, prozentuale Anteil der Aplanosporen niedriger liegt als der der Teilungsstadien, ist auf das frühzeitige (bereits ab 24.00 und 2.00 Uhr) Freiwerden eines Teils der Sporen zurückzuführen. Die Zellen wurden bei den späteren Zählungen um 6.00 oder 8.00 Uhr nicht mehr als Sporen erfaßt.

Tabelle 1. *Verteilung der Zellgrößen in Prozent.*

Serie a — 6.00 Uhr.

Tag	Größen in μ									
	3—4	4—5	5—6	6—7	7—8	8—9	9—10	10—11	11—12	12—13
0										
1	—	8,3	22,9	62,5	4,2	2,1				
2	—	1,8	5,5	40,8	26,0	24,0	1,8			
3	1,2	16,3	47,5	26,2	5,0	3,7				
4	2,4	28,6	43,0	19,0	1,2	3,6	1,2	1,2		
5	1,0	27,2	44,5	20,2	4,0	2,0	1,0			
6	1,2	11,0	13,4	36,6	26,9	7,3	2,4	1,2		
7	—	17,1	22,5	23,4	12,6	18,0	5,4	0,9		
8	11,4	16,2	37,2	26,7	8,6					

Serie a — 22.00 Uhr.

Tag	Größen in μ									
	3—4	4—5	5—6	6—7	7—8	8—9	9—10	10—11	11—12	12—13
0	—	18,6	56,8	23,5						
1	—	1,9	5,9	49,0	23,5	15,7	3,9			
2	—	1,9	7,8	15,7	41,1	9,8	17,7	5,9		
3	—	—	8,5	10,2	22,0	47,5	10,2	1,7		
4	—	—	1,7	21,1	38,6	21,0	14,0	1,7	1,7	
5	1,3	3,9	3,9	54,0	31,6	3,9	1,3			
6	—	3,9	5,9	13,7	51,0	17,7	3,9	3,9		
7	1,0	15,0	41,0	17,0	11,0	4,0	2,0			
8	2,0	14,0	40,0	38,0	6,0	1,0				

[1] Da an diesen beiden Tagen die maximalen Werte bereits um 16.00 Uhr (3. Tag)

Der größte Zelldurchmesser wird hier aber schon — jedenfalls am 3. und 4. Versuchstag — nachmittags erreicht. Man beobachtet ferner, daß hier bereits am Spätnachmittag Teilungsstadien auftreten und daß die Tochterzellen bedeutend schneller frei werden, denn während der Anteil der Teilungsstadien noch zunimmt, treten bereits freie Sporen auf. Bei einem Vergleich der einzelnen Abbildungen untereinander ergibt sich ferner, daß, nachdem das durchschnittliche Zellvolumen seinen maximalen Wert erreicht hat — im Gegensatz zur Serie a —, sich der Anteil an Teilungsstadien weiterhin vermehrt. Wenn aber bei sinkender Zellgröße die Rate der Teilungsstadien ansteigt, dann bedeutet dies, daß Tochterzellen nach kurzer Zeit (4—6 Std), ohne die maximale Zellgröße zu erreichen, neue Teilungen anlegen. Da man also hier nicht wie in der Serie a alle Teilungsstadien oder den größten Teil der Sporen an einem Zeitpunkt erfaßt, wird auch geklärt, weshalb in der kontinuierlich belichteten Serie trotz der intensiven Individuenvermehrung der maximale Wert der Teilungsstadien und Sporen relativ niedrig ist. Auffällig ist, daß auch diese verstärkte Individuenvermehrung vornehmlich in

(Angegeben wird der mittlere Zelldurchmesser in Mikron.)

Serie b — 6.00 Uhr.

Tag	Größen in μ									
	3—4	4—5	5—6	6—7	7—8	8—9	9—10	10—11	11—12	12—13
0										
1	—	4,0	24,0	60,0	10,0					
2	—	1,2	25,0	48,8	8,3	5,5				
3	1,1	8,6	39,8	39,8	6,4	2,2	1,1	1,1		
4	—	10,9	41,7	35,2	5,5	5,5	1,1			
5	2,2	17,8	37,8	32,2	6,6	2,2	1,1			
6	5,0	5,0	23,0	44,0	16,0	4,0	1,0	1,0		
7	3,1	21,4	28,6	34,8	10,7	2,0				
8	2,0	46,5	44,4	6,0	1,0					

Serie b — 22.00 Uhr.

Tag	Größen in μ									
	3—4	4—5	5—6	6—7	7—8	8—9	9—10	10—11	11—12	12—13
0	—	18,6	56,8	23,5						
1	—	—	3,7	3,7	12,0	29,6	28,9	9,2	1,8	
2	—	13,6	15,1	22,7	16,7	13,6	7,5	7,5	1,5	1,5
3[1]	—	—	3,8	22,2	51,9	14,8	7,4			
4[1]	—	1,2	4,9	34,6	48,2	8,6	1,2			
5	4,8	10,6	33,6	38,6	10,6	7,6	9,6			
6	26,8	34,2	18,3	15,8	2,4	2,4				
7	15,2	47,5	25,3	11,2	3,0					
8	9,0	49,0	31,0	10,0	1,0					

und um 12.00 Uhr (4. Tag) ermittelt wurden, werden diese aufgeführt.

der Nacht — also der ehemaligen Dunkelphase — vor sich geht, während die Zunahme des Volumens der Einzelzelle über Tag erfolgt.

Zellenzahl.

Aus den Abb. 5 und 6, in denen die Zellenzahl logarithmisch aufgetragen wurde, geht hervor, daß erst nach einer Induktionsperiode von etwa 48 Std die Individuenvermehrung einsetzt. Die beiden verschieden belichteten Serien a und b unterscheiden sich hier in der Dauer der Induktionsphase, die bei Serie b eher beendet wird. Wie weiter unten noch dargelegt, ist dieses späte Einsetzen der Zellvermehrung nicht als Wachstumshemmung anzusehen.

Die bisherigen Ausführungen zeigen, daß die Individuenvermehrung in der Serie a nur zu ganz bestimmten Zeiten — vornehmlich in der Dunkelphase von 2.00—8.00 Uhr — erfolgt. Insofern ergibt sich auch bei der graphischen Darstellung ein treppenförmiger Kurvenverlauf. Der geringe Anstieg während der Lichtperiode ist auf einige wenige, sich erst spät aus dem Zellverband lösende Sporen zurückzuführen und nicht auf

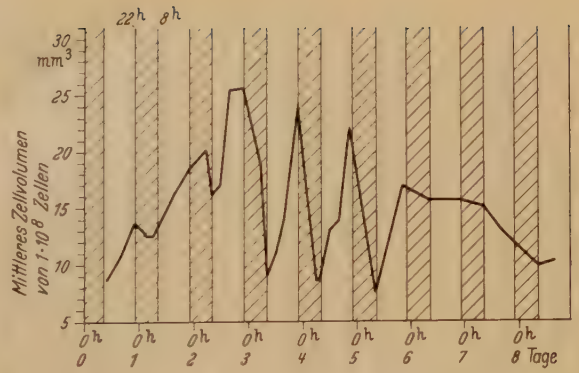


Abb. 1. Das mittlere Zellvolumen von $1 \cdot 10^8$ Zellen. Diskontinuierliche Beleuchtung.

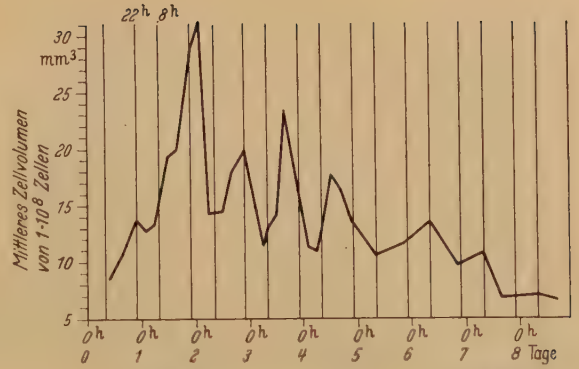


Abb. 2. Das mittlere Zellvolumen von $1 \cdot 10^8$ Zellen. Kontinuierliche Beleuchtung.

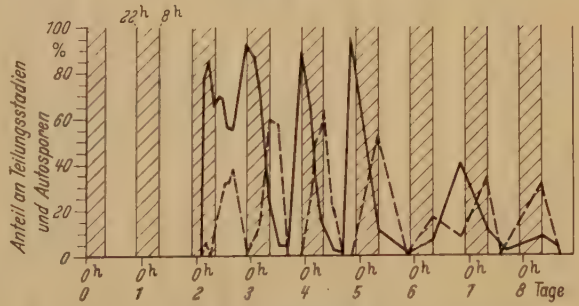


Abb. 3. Der prozentuale Anteil an Teilungsstadien und Sporen. Diskontinuierliche Beleuchtung.
– – – Sporen, ——— Teilungsstadien.

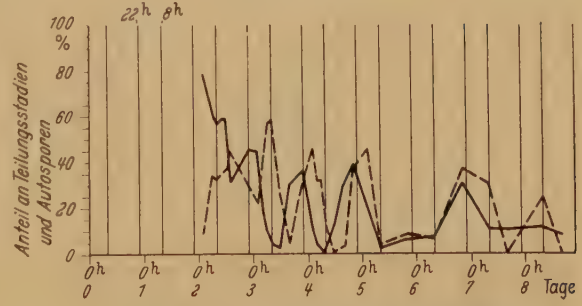


Abb. 4. Der prozentuale Anteil an Teilungsstadien und Sporen. Kontinuierliche Beleuchtung.
– – – Sporen, ——— Teilungsstadien.

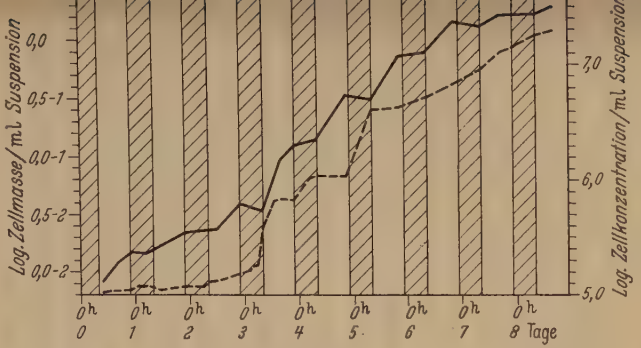


Abb. 5. Vermehrung der Zellkonzentration und der Zellmasse, halblogarithmisch dargestellt. Diskontinuierliche Beleuchtung. ———— Zellmasse, mm³/ml, ——— Zellkonzentration.

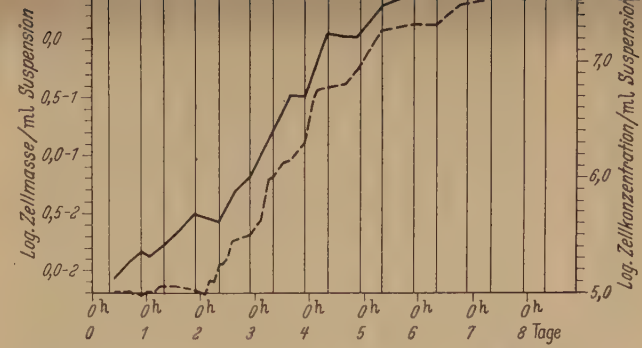


Abb. 6. Vermehrung der Zellkonzentration und der Zellmasse, halblogarithmisch dargestellt. Kontinuierliche Beleuchtung. ———— Zellmasse, mm³/ml, ——— Zellkonzentration.

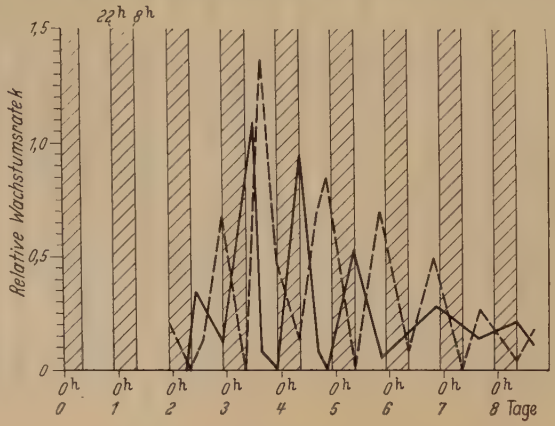


Abb. 7. Relative Wachstumsrate *k*, bezogen auf die Zellkonzentration und die Zellmasse. Diskontinuierliche Beleuchtung. ———— Zellkonzentration, ——— Zellmasse.

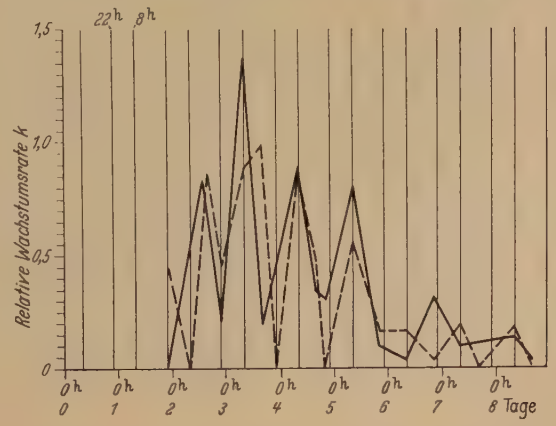


Abb. 8. Relative Wachstumsrate *k*, bezogen auf die Zellkonzentration und die Zellmasse. Kontinuierliche Beleuchtung. ———— Zellkonzentration, ——— Zellmasse.

neu angelegte Zellteilungen. Auch in der kontinuierlich belichteten Serie geht die Zellvermehrung bis zum 5. Versuchstag vornehmlich in der Nacht vor sich.

Zellmasse.

Auch die logarithmisch aufgetragenen Daten der Zellmasse ergeben bei beiden Serien eine stufenförmig verlaufende Kurve. In den diskontinuierlich belichteten Kulturen nehmen die Zellen während der Lichtperiode an Volumen zu. Die in der Dunkelphase erfolgende Individuenvermehrung ergibt also keine wesentliche Änderung der Zellmasse. Erst mit dem Einsetzen des Lichtes und damit der Photosynthese ist wieder eine Zunahme der Masse verbunden. Ganz anders ist der — wenn auch treppenförmige — Kurvenverlauf der kontinuierlich belichteten Serie b; denn hier stellt man auch einen nächtlichen Kurvenanstieg fest. Da diese Beobachtung jedoch im Widerspruch zu den Daten der Abb. 2 steht, wonach sich das Volumen der Einzelzelle nachts verringert, wird in der Schlußbetrachtung nochmals darauf eingegangen. Die relative Wachstumsrate bezogen auf die Zellmasse erreicht in der intermittierend belichteten Serie den höchsten Wert ($k = 1{,}36$, bei Tamiya [1953] $k = 1{,}41$) und liegt damit höher als in der kontinuierlich belichteten Serie ($k = 0{,}99$). Auch hier stellt man mit zunehmendem Alter der Kultur ein Absinken der Werte fest (Abb. 7 und 8).

Induktionsperiode.

Die Induktionsperiode ist bei beiden Serien durch eine gehemmte Individuenvermehrung, aber eine erhebliche Volumenzunahme der Einzelzelle gekennzeichnet. Sie wird in der Serie a gegen Ende des 2., in der Serie b gegen Ende des 1. Versuchstages beendet. In beiden Serien werden zu den genannten Zeiten die höchsten mittleren Zellgrößen mit etwa 8 μ erreicht. Erst danach setzt die starke Individuenvermehrung der logarithmischen Wachstumsperiode ein. Offenbar ist eine ganz bestimmte Zellreife — hier angegeben durch die Zellgröße oder das Volumen — zur Beendigung der Induktionsperiode notwendig. Diese maximale Größe wird in der Serie a später erreicht als in der Serie b. Rechnet man jedoch die relative Lichtmenge aus, die die Serien bis zur Beendigung der Induktionsperiode erhielten, so ergeben sich in beiden Fällen gleiche Werte. Danach wird bei einer Beleuchtungsstärke von 2700 Lux die Induktionsperiode nach 40 Std, die in der Serie a durch die Einschaltung von Dunkelphasen unterbrochen wurde, beendet. Daß unter diesen Bedingungen die Lichtmenge den Ablauf der Induktionsperiode entscheidend beeinflußt, geht auch aus folgendem Befund hervor, der allerdings nicht bei den hier beschriebenen Versuchen, sondern bei anderer Gelegenheit erhalten wurde: Sowohl *Scenedesmus-* wie auch *Chlorella*-Kulturen, die bei verschiedenen Beleuchtungsstärken kultiviert wurden,

beendeten die Induktionsphase bei gleichen relativen Lichtmengen (siehe Tab. 2). Die *Chlorella*-Zellen erreichten dabei wiederum eine maximale mittlere Größe von 8 μ, die *Scenedesmus*-Zellen von 7 μ.

Tabelle 2. *Dauer der Induktionsphase bei verschiedenen Beleuchtungsstärken.*

Beleuchtungsstärke in Lux	Dauer der Induktionsphase in Tagen	Lux-Stunden	
		je Tag	insgesamt
7000	3	98 000	294 000
3500	6	49 000	294 000
2000	10	28 000	280 000

Schlußbetrachtung.

Die oben beschriebenen Versuche und deren Ergebnisse zeigten, daß bei der Kultur im Licht-Dunkel-Wechsel die Individuenvermehrung und der Massenzuwachs von *Chlorella*-Zellen einem bestimmten, durch den Licht-Dunkel-Wechsel induzierten Rhythmus unterworfen sind. Damit stimmt dieser Befund mit denen anderer Autoren (v. Denffer, 1949; Gerdes, 1951; Pirson u. Döring, 1952; Rohde, 1948; Tamiya, 1953) überein. Aber auch die im Dauerlicht kultivierten Chlorellen zeigten nach Induktion einen Rhythmus, der ebenso wie bei den kontinuierlich belichteten Kulturen am 5. Versuchstag endete. Daß auch in diesen Kulturen tatsächlich ein Rhythmus vorhanden war, war deutlich erkennbar an der Häufung von Teilungsstadien und freien Aplanosporen zu bestimmten Zeiten, an der rhythmisch verlaufenden Zu- und Abnahme der mittleren Zellgrößen und insbesondere der Individuenvermehrung. Da von anderer Seite (Pirson u. Döring, 1952) bei einem Stamm von *Chlorella vulgaris* im Dauerlicht kein Beibehalten der durch den Licht-Dunkel-Wechsel induzierten Rhythmik beobachtet wurde, dürfte der Hinweis, daß auch die Wiederholungen des Versuchs das gleiche Ergebnis brachten, berechtigt sein.

So zeigt die Wachstumsrate sehr deutlich, daß die Zellvermehrung in den Abend- und Nachtstunden, also den ehemaligen Dunkelperioden, vor sich geht. Dagegen verläuft die Vermehrung der Masse wohl auch periodisch, aber nicht mehr in der ehemaligen Licht-Phase, wie oben ausgeführt, sondern gleichzeitig mit der Individuenvermehrung in der ehemaligen Dunkel-Phase. Untersucht man dieses Verhalten, so stellt man fest, daß in der kontinuierlich belichteten Serie die Zellproduktion besonders in den Nächten vom 2. bis 5. Versuchstag größer, die mittlere Volumenabnahme der Einzelzelle — die ja beim Freiwerden von Sporen immer beobachtet wird — dagegen bedeutend geringer ist als in der intermittierend belichteten Serie. Diese Differenzen dürften vornehmlich auf die morphologisch und physiologisch verschiedenen Aplanosporen zurückgeführt werden, die in den beiden Serien gebildet werden. So

erhält man nach den Untersuchungen von Tamiya (Mitteilung) aus reifen Zellen (light cells) im Dunkel „nascent dark cells", bei kontinuierlicher Belichtung dagegen „active dark cells", da im Licht die Umwandlung der ersteren in die letzteren sehr schnell vor sich geht. Diese beiden Zelltypen unterscheiden sich aber charakteristisch. So zeigen die Befunde von Tamiya an *Chlorella ellipsoidea*, daß „active dark cells" einen größeren Zellumfang, einen höheren Chlorophyllgehalt und ebenfalls eine höhere Photosynthese-Rate haben als „nascent dark cells". Bei Berücksichtigung dieser Ergebnisse dürfte daher auch der unterschiedliche Verlauf der Substanzproduktion in den beiden Serien erklärt sein. Da die Volumenvermehrung der Zellen nur im Licht vor sich geht, beobachtet man in diskontinuierlich belichteten Kulturen während der Dunkelperiode — auch bei starker Individuenvermehrung — keine Zunahme der Masse. Bei kontinuierlich belichteten Kulturen nehmen dagegen die Zellen sofort nach dem Freiwerden aus der Mutterzelle an Volumen zu: Individuen- und Substanzvermehrung laufen hier parallel.

Auf Grund dieser Versuchsergebnisse erscheint es aber schwierig — zumal Versuche bei Dauerverdunkelung fehlen —, die Ursache für die beobachteten rhythmischen Schwankungen der Individuenvermehrung zu diskutieren. Pirson u. Döring (1952) vermuten bei *Hydrodictyon* eine durch den Licht-Dunkel-Wechsel induzierte strukturelle Änderung im Plasma wie auch einen möglichen Zusammenhang der festgestellten Wachstumsschwankungen mit periodischen Änderungen der Mitosehäufigkeit. Nach Bünning (1952) ist für die vom Licht-Dunkel-Wechsel gesteuerte Teilungsrhythmik die Gegenwart von Chlorophyll eine Hauptbedingung. Auch die hier gemachten Beobachtungen, vornehmlich die gesteigerte Individuenvermehrung der kontinuierlich belichteten Kulturen während der ehemaligen Dunkelperiode, deuten auf eine Beeinflussung der mitotischen Aktivität durch intermittierendes Licht.

Für den synchronen Verlauf der Zellteilungen gibt v. Denffer (1949) eine Erklärung, die auch für die hier besprochenen Kulturen zutreffen kann: Jede Zelle durchläuft einen bestimmten Entwicklungszyklus, der über Aplanospore, junge Zelle bis zur teilungsbereiten Zelle, die wiederum Tochterzellen bildet, geht. Der Ablauf dieses Zyklus dauert eine bestimmte Zeit. Ferner ist zur Anlage von Tochterzellen die Bildung neuer Zellsubstanz notwendig, die nur während der Lichtperiode vor sich gehen kann, falls das Nährmedium keine organischen, von der Zelle verwertbaren Kohlenstoffverbindungen enthält. Durch einen optimalen Licht-Dunkel-Wechsel erreicht man daher einen gleichzeitigen Ablauf des Entwicklungszyklus fast aller Zellen[1]. So zeigt die Abb. 2, daß am Ende

[1] v. Denffer erhielt ein gleichartiges Zellenmaterial durch mehrtägige Verdunkelung.

der Lichtperiode etwa 90% der Zellen in Teilung sind und daß gegen Ende der Dunkelperiode etwa 50—60% der Zellen Aplanosporen und der Rest junge Zellen sind. In einer so behandelten Suspension ist also das Zellmaterial weitgehend gleichaltrig, d. h. im gleichen Entwicklungszustand. Beimpft man hiermit frische Nährmedien und hält die Kulturen im Dauerlicht, so wird — solange Licht im Optimum ist — bei einem großen Teil der Zellen der Entwicklungsgang wiederum gleichzeitig und damit der Rhythmus erkennbar sein.

Bislang wurde sowohl die Massen- wie auch die Individuenvermehrung in Beziehung zur Zeit betrachtet. Dabei zeigte sich, daß die Substanz- und auch die Zellvermehrung bei kontinuierlicher Belichtung stärker war als bei diskontinuierlicher (die gleiche Anzahl von Versuchstagen ist natürlich Voraussetzung). Diese Feststellung sagt aber nichts darüber aus, ob die Vermehrung im Dauerlicht bezogen auf die Lichtmenge ebenfalls günstiger ist als im Licht-Dunkel-Wechsel. Nach Spoehr u. Milner (1949) ist die Vermehrung bezogen auf die Lichtmenge bei kontinuierlichem und diskontinuierlichem Licht gleich und nach den Daten, die Tamiya (1953) gibt, bei diskontinuierlichem Licht bedeutend besser. Auch die Ergebnisse, die hier erhalten wurden (siehe Abb. 9), zeigen, daß bei gleicher Lichtmenge die Substanzproduktion von jungen *Chlorella*-Kulturen im Licht-Dunkel-Wechsel günstiger ist als bei Dauerlicht. Offenbar wird im Dauerlicht eine prozentual geringere Energiemenge aufgenommen und umgewandelt als bei diskontinuierlicher Belichtung.

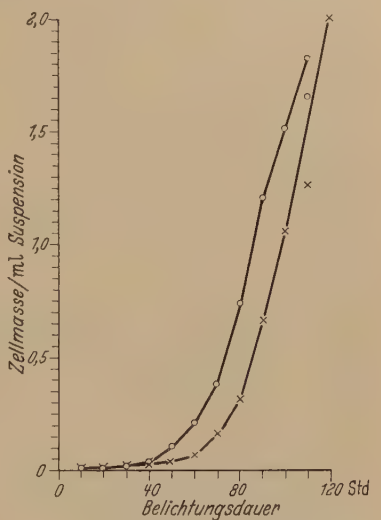


Abb. 9. Vermehrung der Zellmasse von *Chlorella vulgaris*-Kulturen, bezogen auf die Belichtungsdauer. Bei beiden Kulturen betrug die Beleuchtungsstärke 2700 Lux.
—o— unter diskontinuierlicher,
—×— unter kontinuierlicher Belichtung.

Zusammenfassung.

1. Die Individuen- und Zellmassevermehrung eines Stammes von *Chlorella vulgaris* erwies sich bei der Kultur unter diskontinuierlicher Belichtung als abhängig vom Licht-Dunkel-Rhythmus.

2. Kulturen derselben Alge, die mehrere Tage im Licht-Dunkel-Wechsel von 14 : 10 Std kultiviert worden waren, zeigten im Dauerlicht ein Beibehalten der Periodizität, kenntlich an der rhythmisch

verlaufenden Zu- und Abnahme des mittleren Zellvolumens und der Individuenvermehrung.

3. Im Dauerlicht wird je Zeiteinheit mehr Substanz gebildet als bei diskontinuierlicher Belichtung. Bezogen auf die zugeführte Lichtmenge ist dagegen die Vermehrung der Zellmasse im Licht-Dunkel-Wechsel günstiger.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit sind wir dem Herrn Minister für Wirtschaft und Verkehr des Landes Nordrhein-Westfalen dankbar.

Literatur.

Aach, H. G.: Wachstum und Zusammensetzung von Chlorella pyrenoidosa bei unterschiedlichen Lichtstärken und Nitratmengen. Arch. Mikrobiol. **17**, 213—246 (1952). — Arnon, D. I.: Micro-elements in culture solution experiments with higher plants. Amer. J. Bot. **25**, 322—325 (1938). — Bristol Roach, B. M.: On the relation of certain soil algae to some soluble carbon compounds. Ann. of Bot. **40**, 149—201 (1926). — Bünning, E.: Über den Tagesrhythmus der Mitosehäufigkeit in Pflanzen. Z. Bot. **40**, 193—199 (1952). — v. Denffer, D.: Die planktische Massenkultur pennater Grunddiatomeen. Arch. Mikrobiol. **14**, 159—202 (1949). — Gerdes, G.: Änderungen im Aneuringehalt von Algen (physiologischer Zustand, Licht-Dunkel-Wechsel). Arch. Mikrobiol. **16**, 55—77 (1951). — Janke, A.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Dresden: Steinkopff 1946. — Müller, F.: Die Blutkörperchenzählung und die Bestimmung des Blutfarbstoffgehaltes. Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth. IV, 3, 19—62 (1924). — Myers, J.: Culture conditions and the development of the photosynthetic mechanism. IV. Influence of light-intensity on cellular characteristics of Chlorella. J. Gen. Physiol. **29**, 419—427 (1946). — Pearsall, W. H., and L. Loose: The growth of Chlorella vulgaris in pure culture. Proc. Roy. Soc., B., **121**, 451—496 (1937). — Pirson, A., u. H. Döring: Induzierte Wachstumsperioden bei Grünalgen. Flora (Jena) **139**, 314—328 (1952). — Post, J. J.: Anleitung zur Planung und Auswertung von Feldversuchen mit Hilfe der Varianzanalyse. Berlin: Springer 1952. — Rohde, W.: Environmental requirements of fresh-water plankton algea. Symbolae bot. Upsalienses **10**, 1—149 (1948). — Spoehr, H. A., and H. W. Milner: The chemical composition of Chlorella; effect of environmental conditions. Plant Physiol. **24**, 120—149 (1949). — Tamiya, H., K. Shibata, T. Lasa, T. Iwamura and Y. Morimura: Effect of diurnally intermittent illumination on the growth and some cellular characteristics of Chlorella. In: Burlew, J. S.: Algal culture, From laboratory to pilot plant, Carnegie Inst. Washington publ. 600, 76—84 (1953). — Tamiya, H., T. Iwamura, K. Shibata, E. Hase and T. Nikei: Correlation between photosynthesis and lightindependent metabolism. (Nach schriftl. Mitteilung von Herrn Prof. Tamiya.)

Archiv für Mikrobiologie, Bd. 20, S. 423—426 (1954).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut in Göttingen.)

Beobachtungen über die Bewegungsweise von Chytridineenzoosporen*.

Von

A. Gaertner.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 21. März 1954.)

Obwohl der Gestalt und dem Verhalten der einzelligen vegetativen und generativen Fortpflanzungszellen der niederen Phycomyceten besondere Bedeutung sowohl in systematischer wie auch in phylogenetischer Hinsicht zukommt, sind wir in neuerer Zeit erst durch Couch (1938), Sparrow (1935) und Weston (1935) (zit. nach Couch 1941) etwas näher unterrichtet. Die genannten Arbeiten wie auch das reichlich veröffentlichte Material über die Bewegung der pflanzlichen Flagellaten und Algenschwärmer veranlaßten Couch (1941), alles darüber bei den Pilzen Bekannte zusammenzutragen und durch eingehende eigene Untersuchungen weitgehend zu ergänzen.

Im folgenden seien zu diesem Thema einige Beobachtungen mitgeteilt, die an 4 Vertretern der Gattung *Phlyctochytrium* [*Phlyctochytrium* n. sp. *Sv 43*, *Phlyctochytrium* n. sp. *Alg. 3*, *Phlyctochytrium* n. sp. *B 45 I* (Gaertner 1954) und *Phlyctochytrium* n. sp. Reinboldt (Reinboldt 1951)] sowie an *Rhizophidium sphaerotheca* gewonnen wurden, als es gelang, diese Pilze unter Ausschluß aller begleitenden Organismen zu kultivieren.

Betrachtet man die Zoosporen der vier genannten *Phlyctochytrien* in dem Flüssigkeitsfilm, der sich auf Agarnährboden bildet, so zeigt sich, daß ein großer Teil der stark beweglichen, sonst rundlichen Sporen sich in die Länge gestreckt hat und sich stark amöboid mit erheblicher Geschwindigkeit zwischen den bereits zur Ruhe gekommenen Sporen und den heranwachsenden jungen Pflänzchen bewegt. Dabei ist unverkennbar, daß die starke Bewegung nicht auf die amöboide Bewegung der Zoosporenkörper zurückzuführen sein kann, sondern daß der größte Anteil der Bewegung der Geißel als Antriebsorganell der Spore zukommt. Verbessert man die Beobachtungsmöglichkeit dadurch, daß man von der bewachsenen Agaroberfläche sehr vorsichtig eine äußerst dünne Agarschicht abpräpariert und, ohne die Verhältnisse auf dem Agar zu stören, spannungsfrei auf einen Objektträger überträgt und dann vorsichtig mit einem Deckglas bedeckt, so kann man die Bewegungen im Hellfeld und im Phasenkontrast gut beobachten. Jedenfalls behalten die Sporen

* Teilergebnis der Dissertation der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen Alwin Gaertner, „Über das Vorkommen einiger niederer Phycomyceten in Bodenproben von Afrika, Deutschland und Schweden".

dann meist ihre Beweglichkeit bei und verändern auch ihre abnorme Form nicht. Die sich bewegenden Zoosporen führen dann in den meisten Fällen den Insertionspunkt der Geißel in der Bewegungsrichtung voran, während die Geißel dicht am Insertionspunkt umbiegt und entlang des Körpers der Zoospore nach hinten verläuft (Abb. 1a, b, e, j). Über den Geißelfaden ziehen ständig Wellen verschiedener Amplitude, deren Frequenz (als Mittelwert stroboskopischer Messung) etwa 10/sec beträgt; sie beginnen am Endpunkt der Geißel und laufen zum Insertionspunkte hin.



Abb. 1. Bewegung der Zoosporen von *Phlyctochytrium* n. sp. *Sv 43*, gezeichnet mit Phasenkontrastoptik. *a*, *b* Geißel in der Bewegungsrichtung der Spore vorne inseriert, biegt am Körper der Spore um und bleibt weiterhin in der Bewegungsrichtung nach hinten als Schubgeißel tätig. *c*, *d*, *e* Herumwerfen der Geißel unter Versteifung. *f*, *g* Abrundung des Körpers unter Lageänderung des Globuls im Innern, Übergang der Geißel unter Versteifung in Normallage. *h*, *i*, *j*, *k*, *l* Der Körper ist unter Beibehaltung der Lage der Geißel herumgeschlagen und hat sich stark gestreckt (*j*). *m*, *n*, *o* Gleiches Stadium wie *c*—*e*; *n* Kurzfristige Änderung der Bewegungsrichtung. *p*—*y* Ablauf des gleichen Cyclus wie *f*—*m*, wobei starke amöboide Beweglichkeit (*v*—*y*) andauert.

Sofern die abpräparierte Agarschicht überall gleichmäßige Dicke hat und dadurch Ober- und Unterfläche genau parallel verlaufen, sind die Geißeln und ihre Bewegungen im Phasenkontrast sehr deutlich zu beobachten. Hierbei zeigt sich, daß die Spore in der Lage ist, die Geißel auch zu versteifen und wie eine Peitsche auf die andere Seite herüberzulegen (Abb. 1c, d, e, m, n, o). Während dieser Zeit kann sich die Bewegungsrichtung der Spore auch für einen Augenblick umkehren und die Spore sich dabei kurzfristig mit nach hinten gerichteter Geißel in umgekehrter Richtung bewegen (Abb. 1n). Dieser Bewegungsmodus tritt

besonders augenfällig in Erscheinung, wenn man dem Agar 1% Carrageen zusetzt. Die Streckung der Zoosporen kann dann, besonders bei *Phlyctochytrium Sv 43* auf das 4—5fache ihrer Breite erfolgen, während die Beweglichkeit der Sporen in diesem zähen Medium keine Einbuße erfährt.

Diese Fähigkeit der gegenüber den *Rhizophidien* stärker amöboiden Zoosporen der *Phlyctochytrien* stellt vielleicht eine Anpassung an hochviscose Medien dar oder an die Bewegung in dünnen Flüssigkeitsfilmen. Bringt man sich normal mit nach hinten gerichteter Geißel bewegende Sporen im Wassertropfen auf einen durch Abbrennen völlig benetzbar gemachten Objektträger und betrachtet die Sporen im Dunkelfeld, ohne sie mit einem Deckglas zu bedecken, so bewegen sie sich anfangs ganz normal durch das Wasser. Unterschreitet die Dicke des Tropfens nach teilweisem Verdunsten des Wassers einen gewissen Wert, so beginnen die Sporen sich zu strecken und schwimmen dann mit vorn inserierter aber wie oben nach hinten umgebogener Geißel, bis dann schlagartig der Tropfen verschwindet. Überträgt man die sich mit vorn inserierter Geißel bewegenden Zoosporen vom Agar in einen Tropfen frischen Wassers, so runden sie sich sofort wieder ab und schwimmen mit nach hinten gerichteter Cilie wie die übrigen Chytridineensporen. Das gleiche kann eintreten, wenn man mit der Präparation nicht vorsichtig genug verfährt.

Gleiche Wirkung wie der Film auf dem Agar haben reiner Carrageenschleim und Gummi arabicum (*Phlyctochytrium* n. sp. Reinboldt gedeiht allerdings auf diesem Medium nicht), während Traganth in seinen klar löslichen und filtrierbaren Komponenten offenbar abgebaut wird und somit seine Viscosität einbüßt.

Im Gegensatz zu den *Phlyctochytrien* war *Rhizophidium sphaerotheca* nicht in der Lage, diese Metabolie der Bewegung zu zeigen. Die Sporen blieben völlig rund und bewegten sich mit nach hinten gerichteter Schubgeißel durch das Medium und zwar auch dann, wenn man die Viscosität durch Carrageen oder Gummi arabicum erhöhte.

Die Bedeutung dieser Beobachtung scheint darin zu liegen, daß sich hierin ein charakteristisches Unterscheidungsmerkmal zwischen den *Phlyctochytrien* und der Gattung *Rhizophidium* aufzeigt, das in Zweifelsfällen zur eindeutigen Diagnose dieser beiden gleitend ineinander übergehenden Gattungen als physiologisches Merkmal herangezogen werden kann. Jedoch muß dies noch durch weitere Untersuchungen an einer großen Zahl von *Phlyctochytrien* und vor allen Dingen rein kultivierter *Rhizophidien* bestätigt werden.

Zusammenfassung.

Die Zoosporen von 4 Vertretern der Gattung *Phlyctochytrium* (*Phlyctochytrium* n. sp. *Sv 43*, *Phlyctochytrium* n. sp. *Alg. 3*, *Phlyctochytrium B 45 I* und *Phlyctochytrium* n. sp. Reinboldt) sind in der Lage, sich auf

Agar und mit Ausnahme von *Phlyctochytrium* n. sp. Reinboldt, das auf diesem Substrat nicht wächst, auch im Carrageen-Schleim und in Gummi arabicum-Lösung mit vorn inserierter Geißel zu bewegen, wobei dieselbe dicht am Körper der Zoospore umbiegt, nach hinten gerichtet bleibt und meist weiterhin als Schubgeißel fungiert. Dies tritt auch im Wassertropfen auf, wenn er, nicht vom Deckglas bedeckt, eine sehr dünne Schicht auf dem Objektträger bildet. Die Geißel kann sich versteifen und beliebig herumgeworfen werden.

Literatur.

Couch, J. N.: Observations on cilia of aquatic Phycomycetes. Science (Lancaster, Pa.) **88**, 476 (1938) (zit. nach Couch 1941). — The structure and action of the cilia in some aquatic Phycomycetes. Amer. J. Bot. **28**, 704 (1941). — Gaertner, A.: Über das Vorkommen niederer Erdphycomyceten in Afrika, Schweden und Deutschland. Arch. Mikrobiol. **21** (1954). — Reinboldt, B.: Über die Verbreitung einiger niederer Phycomyceten im Erdboden. Arch. Mikrobiol. **16**, 177 (1951). — Sparrow, F. K.: The interrelationships of the Chytridiales. Proc. 6. Internat. Bot. Congr. **2**, 181 (1935) (zit. nach Couch). — Westen, W. H.: The bearing of recent investigations on the interrelationships of the aquatic Phycomycetes. Proc. 6. Internat. Bot. Congr. **1**, 266 (1935) (zit. nach Couch).

Berichtigung

zur Arbeit von **K. H. Domsch**,

Keimungsphysiologische Untersuchungen mit Sporen von Erysiphe graminis

(Arch. Mikrobiol. Bd 20, S. 163—175).

Auf S. 167 sind in der Tabelle 5 die jeweiligen Rubriken „O_2-frei“ und „Kontrolle“ vertauscht.

Autoren-Verzeichnis.

Baalsrud, K., und K. S. Baalsrud, Studies on Thiobacillus denitrificans. S. 34.

Baalsrud, K. S., s. Baalsrud, K. S. 34.

Baldacci, E., C. Spalla and A. Grein, The Classification of the Actinomyces Species (= Streptomyces). S. 347.

Bömeke, H., Über das Verhältnis des oxydierten Stickstoffs zum reduzierten Kohlenstoff beim Nitratbildner. S. 176.

Carlson, S., Der Einfluß niederer Wechselströme auf die enzymatische Tätigkeit von Sproßpilzen unter aeroben Kulturbedingungen. S. 221.

Castelli, T., Les Agents de la Fermentation Vinaire. S. 323.

Coleman, R. J., and F. F. Nord, Application of Mixed Substrates to the Study of Pyruvic Acid Formation by Fusarium lini Bolley. S. 230.

Domsch, K. H., Keimungsphysiologische Untersuchungen mit Sporen von Erysiphe graminis. S. 163, 426.

Droop, M. R., Conditions governing Haematochrome Formation and Loss in the Alga Haematococcus pluvialis Flotow. S. 391.

Floethmann, E., Cytologische Untersuchungen an Azotobacter chrococcum Beij. S. 243.

Gaertner, A., Beobachtungen über die Bewegungsweise von Chytrineenzoosporen. S. 423.

Harder, R., und W. Koch, Zur Frage nach der Identität von Pedinomonas Korschikow und Chlorochytridion Vischer. S. 343.

Kawe, A., s. Oppermann, A. S. 358.

Klein, H. P., s. Starr, T. J. S. 235.

Knösel, D., und W. Schwartz, Untersuchungen zur Erdölbakteriologie. II. Über Vorkommen und Verhalten von Mikroorganismen in Erdöl. S. 362.

Koch, W., s. Harder, R. S. 343.

Korsan-Bengtsen, K., s. Nilsson, P. E., and O. Mellander. S. 404.

Kox, E., Der durch Pilze und aerobe Bakterien veranlaßte Pectin- und Cellulose-Abbau im Hochmoor unter besonderer Berücksichtigung des Sphagnum-Abbaus. S. 111.

Martin, H. H., Beitrag zur Kenntnis der Morphologie und Physiologie der Nektarhefe Candida Reukaufii (Grüss) Diddens et Lodder. S. 141.

Meffert, M.-E., Ein Beitrag zur Wirkung diskontinuierlicher Belichtung auf die Massen- und Individuenvermehrung von Chlorella vulgaris. S. 410.

Mellander, O., s. Nilsson, P. E., and K. Korsan-Bengtsen. S. 404.

Nilsson, G., and P. E. Nilsson, Some Observations on the Use of Cylinders Made from Different Materials in the Cylinder Plate Method. S. 109.

Nilsson, P. E., and C. Rydin, Studies on symbiotic nitrogen fixation by a new strain of tetraploid red clover (UO36). S. 398.

Nilsson, P. E., K. Korsan-Bengtsen and O. Mellander, Amino acid content of leguminous proteins as affected by genetic and nutritional factors. I. S. 404.

Nilsson, P. E., s. Nilsson, G. S. 109.

Nord, F. F., s. Coleman, R. J. S. 230.

Oppermann, A., und A. Kawe, Untersuchungen über die Beeinflussung des Bakteriengehalts und der Nährstoffe im Boden durch den Riesentrichterling (Clitocybe gigantea Sow). S. 358.

Rother, W., Einfluß von β-Indolylessigsäure und wasserlöslichen Wirkstoffen des Mais-Scutellums auf Keimung und Wachstum von Phycomyces Blakesleeanus. S. 89.

Rydin, C., s. Nilsson, P. E. S. 398.

Schlegel, H.-G., Die Rolle des molekularen Wasserstoffs im Stoffwechsel der Mikroorganismen. S. 293.

Schröder, B., Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Neutralsalze auf Wachstum, Zellform und Fadenbildung von Stichococcus Bacillaris und einigen anderen Grünalgen. S. 63.

Schwartz, W., s. Knösel, D. S. 362.

Somm, H., s. Wikén, T., und F. Sulzer. S. 201.

Spalla, C., s. Baldacci, E., and A. Grein. S. 347.
Starr, T. J., and H. P. Klein, Enzymes involved in the utilization of carbohydrates by two strains of myxobacteria. S. 235.
Subramaniam, M. K., s. Thiagarajan, T. R. S. 183.
Sulzer, F., s. Wikén, T., und H. Somm. S. 201.
Tamm, B., Experimentelle Untersuchungen über die Verbreitung des bakteriellen Pflanzenkrebses und das Auftreten von Sekundärtumoren. S. 273.
Thiagarajan, T. R., and M. K. Subramaniam, Studies on the Cytology of Yeasts. IX. Cytology of Cells from a two-day old Giant Colony. S. 183.
Uebelmesser, E.-R., Über den endonomen Tagesrhythmus der Sporangienträgerbildung von Pilobolus. S. 1.
Wetter, C., Über die Wirkung von Agar und Polyvinylalkohol auf das Wachstum von Aspergillus niger. S. 261.
Wikén, T., H. Somm und F. Sulzer, Untersuchungen über den Wuchsstoffbedarf einiger Kulturweinhefen. S. 201.